

Inaugural-Dissertation zur Erlangung der Doktorwürde
der Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität
München

Die Rolle der Kontraktilität von Thrombozyten bei der
Bildung von Biofilmen im Rahmen einer infektiösen
Endokarditis

von Katharina Magdalena Michl
aus Straubing

München 2020

Aus dem Veterinärwissenschaftlichen Department der Tierärztlichen
Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München

Lehrstuhl für Anatomie, Histologie und Embryologie

Arbeit angefertigt unter der Leitung von: Priv.-Doz. Dr. Sven Reese

Angefertigt an der Medizinischen Klinik und Poliklinik I des Klinikums
der Universität München in Großhadern

Mentor: Univ.-Prof. Dr. Steffen Massberg

Gedruckt mit Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität München

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Reinhard K. Straubinger, Ph.D.

Berichterstatter: Priv.-Doz. Dr. Sven Reese

Korreferent: Priv.-Doz. Dr. Sonja Härtle

Tag der Promotion: 25. Juli 2020

Für meine Familie

INHALTSVERZEICHNIS

I.	EINLEITUNG	1
II.	LITERATURÜBERSICHT	2
1.	Thrombozyten	2
1.1.	Ursprung und Morphologie der Thrombozyten	2
1.2.	Die Rolle der Thrombozyten in der Hämostase	4
2.	Aktive Bewegungen der Thrombozyten	6
2.1.	Thrombozytenmigration	6
2.1.1.	Migrationszyklus einer Zelle	7
2.1.2.	Biomechanische Analyse der Thrombozytenmigration	8
2.1.3.	Bedeutung des $\alpha\text{IIb}\beta 3$ -Integrin für die Thrombozytenmigration	9
2.1.4.	MyH9 als Motor der Thrombozytenmigration	10
2.2.	Retraktion eines Blutgerinnsels	11
3.	Thrombozyten und die Interaktion mit Pathogenen	11
3.1.	Direktes Abtöten von Pathogenen	12
3.2.	Pathogen-Einschluss durch Thrombozyten	13
3.2.1.	Immunothrombose	13
3.2.2.	Direktes Binden von Pathogenen durch Thrombozyten	14
3.2.3.	Bündeln von Bakterien durch Thrombozyten	15
4.	Infektiöse Endokarditis	17
4.1.	Pathophysiologie und Ätiologie der infektiösen Endokarditis	17
4.2.	Rolle der Thrombozyten bei der infektiösen Endokarditis	19
4.3.	<i>Staphylococcus aureus</i>	19
4.3.1.	Virulenzfaktoren des <i>Staphylococcus aureus</i>	20
4.4.	Biofilmformation	22
4.4.1.	Lebenszyklus eines Biofilms	22
4.4.2.	Matrix und Struktur des Biofilms	23
4.5.	Therapie der infektiösen Endokarditis	24
III.	ZIELSETZUNG	26
IV.	MATERIAL UND METHODEN	28
1.	Versuchstiere	28

1.1.	Wildtypstamm C57BL/6J	28
1.2.	Pf4-Cre x MyH9 ^{fl/fl}	28
2.	Tierhaltung und Hygienemanagement	29
3.	Narkose	30
4.	Blutentnahme Methoden	32
4.1.	Intrakardiale Blutabnahme	32
4.2.	Blutentnahme über die <i>Vena facialis</i>	32
5.	Bakterien.....	33
5.1.	Bakterienanzucht	33
5.2.	Wachstumskurve.....	33
5.3.	Bakterien in den <i>in vitro</i> und <i>in vivo</i> Experimenten	34
6.	Fluoreszenzmikroskopie.....	34
6.1.	Prinzip.....	34
6.2.	Konfokale Mikroskopie	35
6.2.1.	Das Airyscan-Prinzip	36
7.	<i>In-Vitro</i>- Experimente.....	36
7.1.	Isolation muriner Thrombozyten	36
7.1.	μ-Kammer-Assay.....	37
7.1.1.	Farbstoffe	37
7.1.2.	Durchführung des μ-Kammer-Assays	39
7.1.3.	μ-Kammer-Assay nach Fluss.....	40
7.1.4.	Lebend/tot-Assay	40
7.1.5.	Aufnahme und Auswertung der Gerinnsel	41
7.2.	Transmigrationsassay.....	41
7.2.1.	Transmigrationsassay mit Thrombozyten.....	41
7.2.2.	Transmigrationsassay mit den Sekreten aktivierter Thrombozyten.....	44
8.	Endokarditis Modell.....	45
8.1.	Operationstechnik	46
8.2.	Echokardiografiekontrolle	49
8.2.1.	Prinzip Sonografie	50
8.2.2.	Durchführung der Echokardiografie.....	51
8.3.	Thrombozytenzahlangleichung durch Busulfanbehandlung.....	52
8.4.	Schwanzveneninjektion	52

8.5.	Immunhistologie	53
8.5.1.	Anfertigung der histologischen Schnitte.....	53
8.5.2.	Immunhistologische Färbung des Biofilmes	53
8.5.3.	Immunhistologische Färbung des Klappenendothels	55
8.5.4.	Aufnahme und Auswertung der Aortenklappen	56
9.	Statistik	56
V.	ERGEBNISSE	58
1.	Fluoreszenzmikroskopische Analyse von Thrombozyten und der Beteiligung ihrer kontraktilen Kräfte bei der Interaktion mit Bakterien im Gerinnsel	58
1.1.	Thrombozyten strukturieren das Fibrinnetzwerk.....	58
1.2.	Thrombozyten interagieren im Gerinnsel mit Bakterien	60
1.2.1.	Die Interaktion von Thrombozyten mit Bakterien im Fibringerinnsel ist Myosin IIa abhängig	61
1.2.2.	Thrombozyten bündeln Bakterien im Gerinnsel.....	63
1.3.	Analyse der Gerinnsel unter Fluss-Bedingungen	65
1.3.1.	Thrombozyten strukturieren Gerinnsel unter Fluss-Bedingungen.....	65
1.3.2.	Thrombozyten nutzen ihre kontraktilen Kräfte zur Immobilisierung der Bakterien unter Fluss	66
1.3.3.	Thrombozyten binden Bakterien auch unter Fluss-Bedingungen.....	68
1.3.4.	Die Größe der Bakterienaggregate wird durch Fluss nicht beeinflusst	70
1.4.	Thrombozyten töten Bakterien im Gerinnsel ab.....	73
2.	Untersuchung der Retention von Bakterien durch Thrombozyten anhand des Transmigrationsassays.....	76
2.1.	Das Fibrinnetzwerk verzögert die Transmigration der Bakterien.....	76
2.2.	Thrombozyten verändern durch ihre Kontraktilität die Morphologie der Gerinnsel	77
2.3.	Die Bakterien-Transmigration wird durch die bakterizide Wirkung der Thrombozyten beeinträchtigt	78
3.	Endokarditis Model	80
3.1.	Ultraschallkontrolle	81
3.2.	Biofilmformation an C57BL/6J-Mäusen	83
3.3.	Biofilmformation an Pf4-Cre x MyH9 ^{flox/flox} - Mäusen	85

VI.	DISKUSSION.....	92
VII.	ZUSAMMENFASSUNG	108
VIII.	SUMMARY	109
IX.	ABBILDUNGSVERZEICHNIS	110
X.	TABELLENVERZEICHNIS.....	112
XI.	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	113
XII.	LITERATURVERZEICHNIS.....	115
XIII.	DANKSAGUNG.....	139

I. EINLEITUNG

Thrombozyten sind im Allgemeinen für ihre Rolle in der Hämostase und Thrombose bekannt [1]. Durch das Zusammenspiel mit Koagulationsfaktoren und Fibrin bilden sie einen Thrombus, der im Notfall den Organismus vor dem Verbluten bewahrt. Neueste Erkenntnisse aus der immunologischen Forschung erweitern die klassische Bedeutung der Koagulation und charakterisieren sie als einen effizienten Mechanismus, um Pathogene in einem Netzwerk aus Fibrin einzuschließen und sie an einer Dissemination zu hindern [2]. Dabei agieren Thrombozyten als zentrale Zellen und greifen mit ihren prokoagulatorischen Funktionen [3, 4] und ihren Interaktionen mit Pathogenen und Fibrin aktiv in das Geschehen ein [5]. Diese ursprünglich schützende Funktion der Koagulation machen sich verschiedene Bakterien jedoch zunutze. Mit Hilfe ihrer Virulenzfaktoren kurbeln sie die Aktivität der Thrombozyten und die Bildung von Fibrin absichtlich weiter an, bis sich die Bakterien unter einem Schutzmantel aus Fibrin und Thrombozyten befinden, unter dem sie sich ungehindert vermehren können und der sie vor der wirtseigenen Immunantwort schützt [6]. Diese sogenannten Biofilme, die häufig im Rahmen einer infektiösen Endokarditis auftreten, stellen die moderne Medizin vor eine große Herausforderung, da antimikrobielle Therapien oftmals scheitern, weil sie die Bakterien im Kern des Biofilms nicht erreichen können [7, 8]. Da Thrombozyten im Prozess der Koagulation eine zentrale Rolle spielen und im Biofilm meist die einzigen Zellen sind, die mit den Bakterien in Kontakt stehen, rücken sie in den Fokus alternativer Therapieansätze.

Unsere Arbeitsgruppe konnte kürzlich zeigen, dass Thrombozyten im Rahmen ihrer Migration und unter Aufwand Aktomyosin-abhängiger Kräfte, Fibrin als Matrix nutzen, um Bakterien auf einer Oberfläche zu bündeln [9]. Ziel der vorliegenden Arbeit ist es, die Interaktionen zwischen Thrombozyten und Bakterien in einem dreidimensionalen Fibrinnetzwerk zu untersuchen und dabei die Rolle der Kontraktilität von Thrombozyten aufzuklären. Außerdem soll die Beteiligung dieser Kräfte an der Formation, Struktur und Zusammensetzung eines Biofilms erforscht werden. Ein besseres Verständnis der Interaktionen von Thrombozyten, Fibrin und Bakterien im Biofilm ist unentbehrlich, um daraus therapeutische Strategien ableiten zu können.

II. LITERATURÜBERSICHT

1. Thrombozyten

1.1. Ursprung und Morphologie der Thrombozyten

Thrombozyten sind scheibenförmige Blutzellen mit einer Größe von 1–3 μm [10]. Sie werden im Knochenmark gebildet und von Megakaryozyten in den Blutstrom abgegeben. Megakaryozyten bilden dabei sogenannte Proplatelets, von denen sich mehrere tausend kernlose Thrombozyten abschnüren können. Die Produktion von Thrombozyten wird hierbei vor allem durch Thrombopoetin reguliert [11, 12]. Nach Verlassen des Knochenmarks zirkulieren im Blut des Menschen 150–400 $\times 10^3$ Thrombozyten pro μl und bei der Maus 1000–1500 $\times 10^3$ pro μl Blut [10, 13]. Nach einer Lebensspanne von etwa zehn Tagen, werden die Thrombozyten in der Milz, Leber und Lunge eliminiert [14]. Da Thrombozyten kernlose Zellen sind, weisen sie keine DNA auf. Durch den Besitz von messenger RNA sind sie jedoch in der Lage Proteine zu synthetisieren. Sie sind mit verschiedenen Zellorganellen ausgestattet. Diese Zellorganellen, bestehend aus Mitochondrien und Granula, sitzen zusammen mit den zytoskelettbildenden Aktinfilamenten und Mikrotubuli und einem komplexen Membransystem im Zytoplasma. Das Membransystem besteht zum einen aus dem offenen kanalikulären System (OCS), das als Kalziumionenspeicher große Bedeutung bei der Thrombozytenaggregation einnimmt. Zum anderen schließt es das dichte Röhrensystem (DTS) ein, das wichtige metabolische Enzyme speichert [15] (siehe Abbildung 1). Die Ausschüttung von Inhaltsstoffen ihrer Granula gehört zu den bedeutendsten Funktionen der Thrombozyten, denn so können sie nach ihrer Aktivierung ihre Mikroumwelt unmittelbar modifizieren [16]. Die Thrombozyten besitzen drei Arten von Granula:

Die elektronendichten Granula („dense granule“ oder δ -Granula) beinhalten hohe Mengen an Serotonin, Adenosindiphosphat (ADP), Adenosintriphosphat (ATP) und Kalzium [17]. Mit ihrer Hilfe können sich die Thrombozyten aggregieren und so ein stabiles Blutgerinnsel bilden. Herrscht genetisch bedingt ein Mangel an elektronendichten Granula, äußert sich das in einer verzögerten Gerinnung [18].

Der Inhalt der α -Granula setzt sich auf der einen Seite aus Membran-gebundenen Proteinen zusammen, die auf der Oberfläche von Thrombozyten exprimiert werden. Auf der anderen Seite besteht er aus löslichen Proteinen, die in den extrazellulären Raum abgegeben werden. Zu den Membran-gebundenen Proteinen gehören unter anderem die Integrine und Rezeptoren für Immunglobulinfamilien. Besonders hervorzuheben ist hierbei das Integrin $\alpha\text{IIb}\beta 3$ (GPIIb-IIIa). Es ist als Oberflächenrezeptor für die Bindung von Fibrinogen verantwortlich und somit maßgeblich an der Thrombozytenaggregation und der Bildung eines Thrombus beteiligt [19]. Als lösliche Plasmaproteine enthalten sie neben dem Von-Willebrand-Faktor (vWF) und Fibrin(ogen) auch diverse Gerinnungsfaktoren und deren Kofaktoren [20]. Des Weiteren sezernieren die α -Granula das Prokoagulant Thrombin und seinen Gegenspieler Antithrombin. Sie tragen zur Balance der sekundären Hämostase bei [21].

Lysosome speichern proteolytische Enzyme, Glykosidasen und kationische Proteine mit bakterizider Wirkung. Durch die Ausschüttung ihrer Inhaltsstoffe, unterstützen sie die Zerstörung von Krankheitserregern [22].

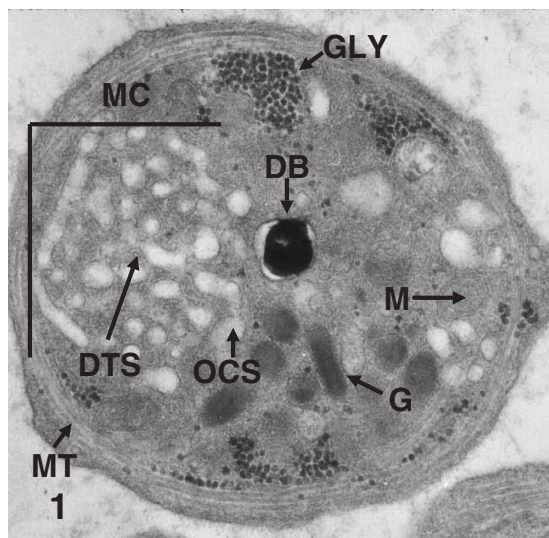


Abbildung 1: Elektronenmikroskopische Aufnahme eines Thrombozyten

Die Abbildung zeigt die subzelluläre Organisation eines inaktiven Thrombozyten. Die randständigen Mikrotubuli (MT) umrunden das Zytoplasma des Thrombozyten und halten es in seiner scheibenartigen Form. Zahlreiche α -Granula (G) und vereinzelte elektronendichte Granula (DB) sind im Zytoplasma eingebettet. Das offene kanalikuläre System (OCS) und das dichte Röhrensystem (DTS) formen den Membrankomplex (MC) [23].

Polyploide Megakaryozyten und kernlose Thrombozyten findet man ausschließlich beim Säugetier. Niedrigere Vertebraten wie Vögel, Reptilien, Amphibien und Fische, besitzen kernhaltige Thrombozyten [24]. Intervertebraten haben per se keine Thrombozyten, sondern besitzen zirkulierende kernhaltige Zellen in ihrer Hämolymphe, die Hämozyten [25, 26]. Diese sind in ihrer Struktur und Funktion den Makrophagen der Vertebraten sehr ähnlich, denn auch sie exprimieren Toll-like-Rezeptoren, vermitteln Phagozytose und sezernieren antimikrobielle Peptide [25, 26]. Hämozyten beschleunigen aber auch die Wundheilung und sind in der Lage, im Falle einer Gewebsverletzung die Gerinnung der Hämolymphe einzuleiten [25, 26]. Die Parallelen der uranfänglichen hämatologischen Reaktionen, könnten Hinweise auf eine evolutionäre Bindung zwischen der angeborenen Immunantwort und der Thrombozytenfunktion geben. Eventuell entwickelten sich während der Evolution die hämostatischen und immunologischen Funktionen der Hämozyten auseinander und endeten in der Erschaffung von Thrombozyten und Leukozyten. Dieser Ursprung in den Hämozyten, könnte die Erklärung für die zahlreichen immunologischen Funktionen der Thrombozyten der Säugetiere sein, die bis heute fortbestehen [27].

1.2. Die Rolle der Thrombozyten in der Hämostase

Seit ihrer Entdeckung von Bizzozzo in den 1880er Jahren ist bekannt, dass Thrombozyten zur Hämostase beitragen, einem lebenswichtigen Prozess, der Blutungen nach einer Gefäßverletzung stillt [1].

Sie heften sich im Falle einer Verletzung an der geschädigten Gefäßwand an. Dieser Prozess erfordert eine Vielzahl an Signalkaskaden und ist abhängig von Glykoproteinen, die an der Oberfläche der Thrombozyten exprimiert werden [28]. Liegt keine Verletzung vor und ist die Gefäßwand unversehrt, wirkt das intakte Endothel durch die Produktion von Prostazyklin und Stickstoffmonoxid inhibitorisch und die Thrombozyten bleiben inaktiv. Die Bildung dieser Stoffe ist bei einer Gefäßverletzung jedoch herabgesetzt und extrazelluläre Matrixproteine, wie Kollagen, sind der Zirkulation ausgesetzt [29]. Unter bestimmten Blutflussbedingungen verlangsamten sich die Thrombozyten an der Stelle der Gefäßverletzung. Das Plasmaprotein von vWF bindet sich an das Kollagen an der Oberfläche des Subendotheliums und bildet so vor allem unter hohen Schubspannungen („shear stress“) eine Grundlage für die Adhäsion der

Thrombozyten. Die verschiedenen Bindungsstellen des vWF-Multimers schaffen ersten Kontakt zum GPIIb/V/IX Komplex auf der Oberfläche der Thrombozyten, die dadurch eingefangen und nun fest gebunden sind [30, 31]. Diese Adhäsion aktiviert die Thrombozyten, die daraufhin Thrombozytenagonisten wie ADP und Thromboxan (TXA₂) aus den elektronendichten Granula sowie Fibrinogen, Faktor V und P-Selektin aus den α -Granula freisetzen. ADP und TXA₂ verstärken die Aktivierung der Thrombozyten und rekrutieren weitere zirkulierende Thrombozyten zur geschädigten Gefäßwand [32, 33]. Des Weiteren verursachen sie eine Formveränderung der Thrombozyten. Durch eine Reorganisation des Aktin-Zytoskeletts verwandelt sich der Thrombozyt von seiner Scheibenform in eine Kugelform und bildet Pseudopodien aus. Mithilfe dieser Zellfortsätze vergrößert der Thrombozyt seine Oberfläche um ein Vielfaches und kann sich untereinander vernetzen, um einen Thrombozytenaggregat zu bilden [34].

Zeitgleich zur Thrombozytenrekrutierung wird bei einer Gefäßverletzung auch die Koagulationskaskade aktiviert. Während die Thrombozytenaggregate eine erste provisorische Abdeckung der Wunde darstellen, die rasch wieder abgeschwemmt werden kann, werden durch die Gerinnung auch Fibrin und Erythrozyten eingefangen, wodurch ein mechanisch stabiler Thrombus entsteht. Die Bildung von Fibrin wird vom Gewebefaktor ("tissue factor", TF) eingeleitet, einem Membranprotein, das dem Blut nur bei einer Gewebsverletzung ausgesetzt ist. Im Rahmen der Koagulationskaskade wird über einen Rückkopplungsmechanismus schließlich das Enzym Thrombin produziert, einem zentralen Regulator der Hämostase, der Fibrinogen zu Fibrin spaltet. Durch den GPIIb/IIIa Rezeptor können die Thrombozyten Fibrin(ogen) binden, das durch sein dreidimensional verzweigtes Netzwerk aus Fibrinfasern eine Brücke zwischen den adhäsiven Thrombozyten formt, diese quervernetzt und so zur Stabilität des Thrombus beiträgt [2, 35] (siehe Abbildung 2).

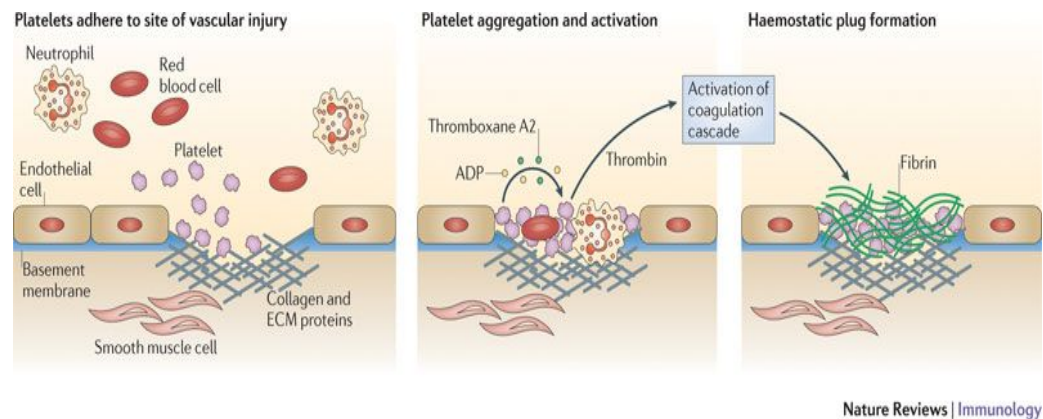


Abbildung 2: Schematische Darstellung der Hämostase

Links: Im Rahmen einer Gefäßverletzung wird die subendotheliale Matrix freigelegt. Über den vWF und Kollagenfasern heften sich die Thrombozyten an.

Mitte: Die adhärennten Thrombozyten ändern ihre Form, aggregieren daraufhin und setzen aus ihren Granula die Thrombozyten-aktivierenden Stoffe, ADP und TXA₂, frei. Weitere Thrombozyten werden rekrutiert.

Rechts: Der durch die Gefäßverletzung dem Blut exponierte TF leitet die Koagulationskaskade ein. Das dabei entstehende Thrombin führt zur Bildung von Fibrin und sorgt durch die Quervernetzung der Thrombozyten über den GPIIb/IIIa Rezeptor für einen mechanisch stabilen Thrombus [27].

vWF = Von-Willebrand-Faktor, ADP = Adenosindiphosphat, TXA₂ = Thromboxan, TF = Gewebefaktor

mit freundlicher Genehmigung von Copyright Clearance Center, Springer Nature, Copyright © 2011

2. Aktive Bewegungen der Thrombozyten

2.1. Thrombozytenmigration

Weil Thrombozyten keinen Zellkern haben, wurden sie lange Zeit als passive Zellen angesehen. 1959 haben Bettex-Galland *et al.* ein Aktomyosin-ähnliches Protein in humanen Thrombozyten nachgewiesen; ein erster Hinweis darauf, dass Thrombozyten über ein kontraktiles Zytoskelett verfügen und die molekulare Basis der Zellmigration besitzen [36]. In späteren Jahren folgten weitere Publikationen, die die Thrombozytenmigration als aktiven biologischen Prozess und als Reaktion auf chemotaktische Reize darstellten [37-42]. Eine grundlegende Analyse der biomechanischen Prinzipien, die der autonomen Thrombozytenmigration unterliegen, konnte jedoch erst kürzlich von der Arbeitsgruppe um Gärtner *et al.* beschrieben werden [9].

2.1.1. Migrationszyklus einer Zelle

Die Zellmigration zeichnet sich durch eine wiederholte Abfolge von vier aufeinanderfolgenden Schritten aus: Zuerst kommt es zur Ausbildung von Membranprotrusionen („Leading Edge“) am vorderen Teil der Zelle. Mit deren Hilfe heftet sich die Zelle über Adhäsionsrezeptoren am Substrat fest an. Nachfolgend kontrahiert sich das Zytoplasma und die Kontaktstellen werden gelöst [43] (siehe Abbildung 3). Voraussetzung dieser Migrationszyklen ist die Fähigkeit zur morphologischen Polarisation, die häufig durch ein steuerndes „Leading Edge“, den Lamellipodien und dem „Trailing Edge“, dem Zellkörper charakterisiert sind. Quantitative morphometrische Analysen haben gezeigt, dass die Ausbildung des Leading Edge hauptsächlich von der Polymerisation von Aktin abhängt, während das Trailing Edge größten Teils von einer Myosin-IIa-vermittelten Kontraktion gestaltet wird [44, 45].

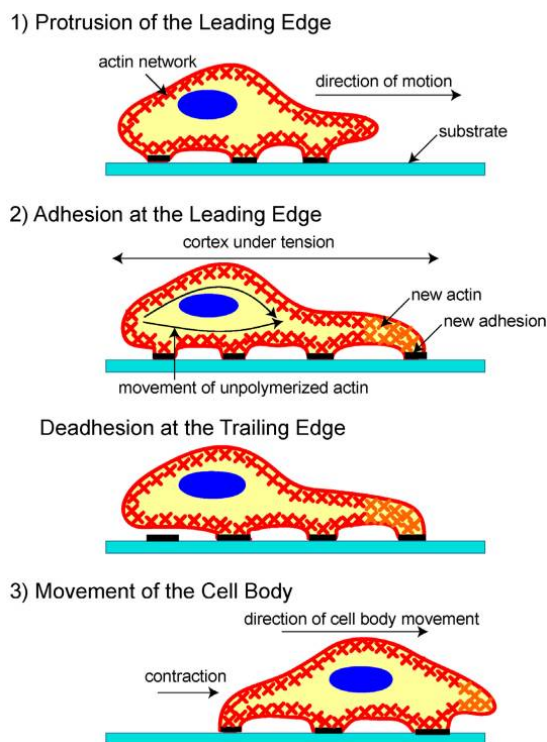


Abbildung 3: Schematische Darstellung der vier Schritte der Zellmigration

- 1) Die Zelle bildet Protrusionen durch Aktinpolymerisation
- 2) Sie heftet sich am Leading Edge an die Oberfläche an
- 3) Durch Myosin IIa-abhängige, kontraktile Kräfte zieht sich die Zelle zusammen und löst sich vom Substrat [46]

Mit freundlicher Genehmigung von Ivyspring International Publisher, Copyright © 2007

Durch den dynamischen Auf- und Abbau der Aktinfilamente wird die Protrusion der Zelle durch den Einbau von Membranmaterial erweitert [47]. Dabei unterscheidet man zwischen den größeren und flacheren Protrusionen, den Lamellipodien und den kleineren, fadenförmigen Filopodien. In den Lamellipodien werden die Aktinfasern dabei netzartig angeordnet und die Aktinpolymerisation wird durch den Arp2/3-Komplex vermittelt [48]. Dieser bindet an einer bereits bestehenden Aktinfaser und induziert die Bildung einer neuen Faser, die von der Mutterfaser abzweigt. In den Filopodien dagegen werden die Aktinfasern in langen, parallelen Bündeln organisiert. Die Aktinfasern eines Bündels verlängern sich an ihrem stumpfen Ende und entlassen Aktinmonomere von ihrem spitzen Ende (Treadmilling („Tretmühlen“) - Mechanismus) [48]. Die Aktinfasern produzieren durch das Wachstum des Polymers die physikalischen Kräfte, die das Lamellipodium in Bewegungsrichtung wachsen lassen [47]. Diese Kräfte sind für die Formveränderung der meisten motilen eukaryotischen Zellen und ihre aktive Bewegung essentiell [47, 49]. Die Kraft zur Kontraktion der Zelle wird von Myosin IIa generiert [50]. Myosin IIa erzeugt kontraktile Kräfte, die den hinteren Teil der Zelle einziehen und die Adhäsionskontakte lösen [51]. Die Aktivität von Myosin IIa hängt von der Phosphorylierung der Myosin Light Chain (MLC) ab, die wiederum durch die Kalzium-abhängigen Myosin Light Chain Kinase (MLCK) und die Rho-assoziierte Proteinkinase (ROCK) reguliert wird [52].

Beide Prozesse müssen streng koordiniert werden, um sowohl Zugkraft als auch Vorwärtsbewegung zu erzielen. Ihr Gleichgewicht bestimmt die Form und Geschwindigkeit der Zelle [53].

2.1.2. Biomechanische Analyse der Thrombozytenmigration

Um die mechanischen Grundlagen der Thrombozytenmigration zu erforschen, wurde ein *in vitro* Assay etabliert. Dazu wird ein Deckgläschen mit Fibrin(ogen) beschichtet. Anschließend werden Thrombozyten mit ADP und TXA₂ aktiviert und auf das beschichtete Deckgläschen gegeben. Die Thrombozyten heften an das Fibrin(ogen) an, fangen an sich auszubreiten, reorganisieren ihr Zytoskelett und beginnen zu migrieren. Die Mediatoren ADP und TXA₂ sind dabei sowohl für das Auslösen als auch für die Aufrechterhaltung der Thrombozytenmigration notwendig [9].

Die Migration der Thrombozyten wird stets mit einer charakteristischen Veränderung der Thrombozyten-Morphologie eingeleitet. Die Thrombozyten breiten sich aus („spreading“) und nehmen eine Spiegelei-ähnliche Form an. Daraufhin beginnen sie zu polarisieren, indem sie Protrusionen ausbilden und gleichzeitig den gegenüberliegenden Teil der Zelle einziehen. Während dieses Prozesses wird der Pseudonukleus vom Zentrum des Thrombozyten an das hintere Ende der Zelle verlagert [9] (siehe Abbildung 4). Die Morphologie des Thrombozyten ist nun halbmondförmig [54]. Die Tatsache, dass Thrombozyten Migration und Formveränderungen auch bei arteriellen Flussraten und Shear Stress zeigen und gegen die Flussrichtung migrieren können, weist darauf hin, dass es sich um einen autonomen und aktiven Zellprozess handelt [9].

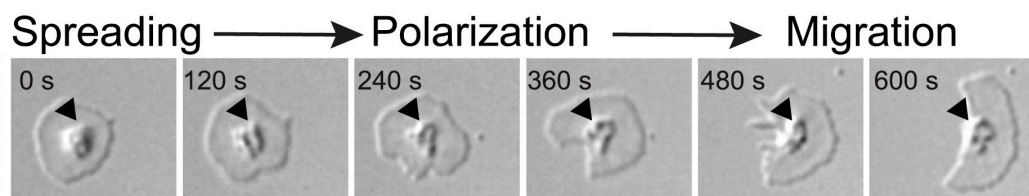


Abbildung 4: Beginn der Thrombozytenmigration

Die Videosequenzen aus einer Phasen-Kontrast-Aufnahme zeigen die morphologischen Veränderungen des Thrombozyten während der initialen Phase der Migration. Nach seiner Adhäsion breitet sich der Thrombozyt aus und hat eine Spiegelei-ähnliche Form. Durch Ausstülpungen von Lamellipodien und durch Einziehung der gegenüberliegenden Seite, polarisiert er. Dabei wandert der Pseudonukleus (Pfeil) vom Zentrum der Zelle in den hinteren Teil und der Thrombozyt nimmt die Form eines Halbmondes an [9].

Mit freundlicher Genehmigung von Copyright Clearance Center, Elsevier, Copyright © 2017

2.1.3. Bedeutung des $\alpha\text{IIb}\beta 3$ -Integrin für die Thrombozytenmigration

Thrombozyten sind im Besitz diverser Integrinrezeptoren, unter anderem des $\alpha\text{IIb}\beta 3$ -Integrins, das ausschlaggebend für das Spreaden der Thrombozyten verantwortlich ist, wenn diese durch Agonisten wie ADP und TXA_2 aktiviert werden [55]. Während der Thrombozytenmigration wird das aktivierte $\alpha\text{IIb}\beta 3$ -Integrin entlang des Lamellipodiums in Clustern exprimiert. Wird die Integrin-Bindung durch Peptide geblockt, reduziert das die Ausbildung des Lamellipodiums und verhindert gleichzeitig die Migration der Thrombozyten. Daher können Thrombozyten von Patienten mit Glanzmann-Thrombasthenie, die ein defektes $\alpha\text{IIb}\beta 3$ -Integrin exprimieren, weder spreaden noch migrieren [9].

Der physiologische Ligand des $\alpha\text{IIb}\beta 3$ -Integrins ist Fibrinogen. Liegt keine Gefäßverletzung vor, ist der Rezeptor inaktiv und kann kein Fibrinogen binden.

Erst durch die Aktivierung der Thrombozyten, ändert sich die Konformation des Rezeptors in die aktive Form und er ist daraufhin in der Lage, Fibrinogen mit hoher Affinität zu binden. Dies führt während der Hämostase zur Quervernetzung des Thrombozyten und zur Entstehung eines Thrombus [56]. Fibrinogen kann zwar das Spreaden der Thrombozyten induzieren, reicht jedoch nicht für die Migration der Thrombozyten aus. Für diese werden zusätzlich die Plasmakomponenten Albumin und Kalzium benötigt [9]. Während Albumin das Haftvermögen des Fibrinogens reduziert [57] und somit das für die Fortbewegung wichtige Ablösen vom Substrat fördert, ist Kalzium für die Aktivierung von Myosin erforderlich. Beide Substanzen sind für die charakteristische Polarisierung und die Veränderung der Thrombozytenmorphologie notwendig [9].

2.1.4. MyH9 als Motor der Thrombozytenmigration

Intrazelluläres Kalzium spielt eine grundlegende Rolle bei der Steuerung von Thrombozytenfunktionen [58] und der Polarisierung migrierender Zellen [59]. Durch die Aktivierung von Myosin IIa nimmt intrazelluläres Kalzium auch entscheidenden Einfluss auf die Thrombozytenmigration [9]. Wird die Myosin IIa vermittelte Kontraktion durch den Myosin-Inhibitor Blebbistatin gehemmt, können Thrombozyten zwar noch ihr Lammellipodium ausstülpen, sind jedoch nicht in der Lage, die Zugkraft zur Retraktion ihres Trailing Edges aufzubringen. Da sie die Adhäsionskräfte des Substrats nicht überwinden können, wird ihre Fortbewegung folglich unterbunden (siehe Abbildung 5). Gleiches gilt für Thrombozyten von Pf4-Cre x MyH9^{fl/fl}-Mäusen, die eine erheblich geringere Menge Myosin in den Megakaryozyten exprimieren [9].

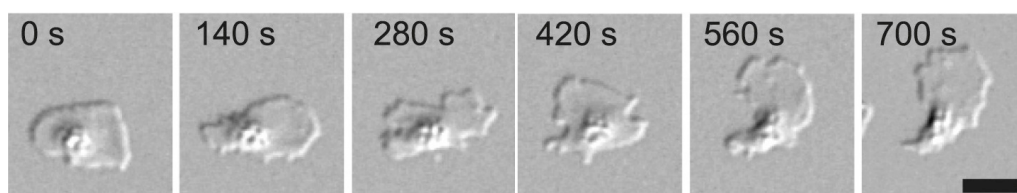


Abbildung 5: Blebbistatin-behandelte Thrombozyten

Die Phasen-Kontrast-Aufnahme zeigt einen mit Blebbistatin (50 μ M) behandelten Thrombozyten. Durch die Hemmung des Myosin II durch das Blebbistatin kann der Thrombozyt zwar polarisieren, jedoch sein Trailing Edge nicht vom Substrat lösen. Durch funktionale Abgrenzung vom vorderen und hinteren Teil wird der Thrombozyt in die Länge gezogen [9].

2.2. Retraktion eines Blutgerinnsels

Die Kontraktion von Blutgerinnseln ist ein überaus wichtiger Prozess im Rahmen der Hämostase und Wundheilung [60]. Durch die Kontraktion wird der Blutfluss wiederhergestellt und Blutgefäße vor einer Obstruktion durch Blutgerinnsel geschützt [61]. Thrombozyten sind kontraktile Zellen [62]. Dabei nutzen sie den gleichen intrazellulären Kontraktionsmechanismus wie Muskelzellen, Endothelzellen und Fibroblasten: Als kontraktile Einheit interagiert Myosin IIa mit Aktin und führt zu einer Reorganisation ihres Zytoskeletts [63, 64]. Das $\alpha\text{IIb}\beta 3$ -Integrin fungiert dabei als transmembrane Bindung zwischen dem Thrombozyten und dem extrazellulären Fibrin [65, 66]. In ihrer aktivierten Form sind Thrombozyten in der Lage, kontraktile Kräfte aufzubringen [67], die sie auf die Fibrinfasern ausüben [68] und auf diese Weise das Volumen des gesamten Fibringerinnsels reduzieren [69, 70].

Die Extension und Retraktion der Thrombozyten-Filopodien ist eine grundlegende Funktion für die Kraftübertragung der Thrombozyten auf die Fibrin-Matrix [71]. Aktivierte Thrombozyten biegen und verkürzen einzelne Fibrinfasern, indem sich ihre Filopodien abwechselnd strecken und zusammenziehen – ähnlich einem Tauziehen [71]. Dadurch akkumulieren sie Fibrinogen auf ihrer Oberfläche, das zunehmend mit den Thrombozyten kolokalisiert. Im Zuge dessen verdichten die Thrombozyten die Fasern und ziehen einander näher, bis sie einen Zellaggregat bilden, von dem eine Vielzahl an Fibrinfasern ausstrahlen [71]. Diese Extension und Retraktion ist Myosin IIa abhängig und kann durch Blebbistatin gehemmt werden.

3. Thrombozyten und die Interaktion mit Pathogenen

Während in der Hämostase die Thrombozyten Gemeinschaftsarbeit leisten, rückt in der Immunantwort der einzelne Thrombozyt in den Vordergrund. Durch das Abtöten und Festhalten von Bakterien und die Interaktionen mit Leukozyten erfüllt jeder Thrombozyt wichtige Funktionen und leistet erste Abwehr gegen potentielle Pathogene (siehe Abbildung 6).

PREVENTION OF SYSTEMIC SPREAD AND ERADICATION

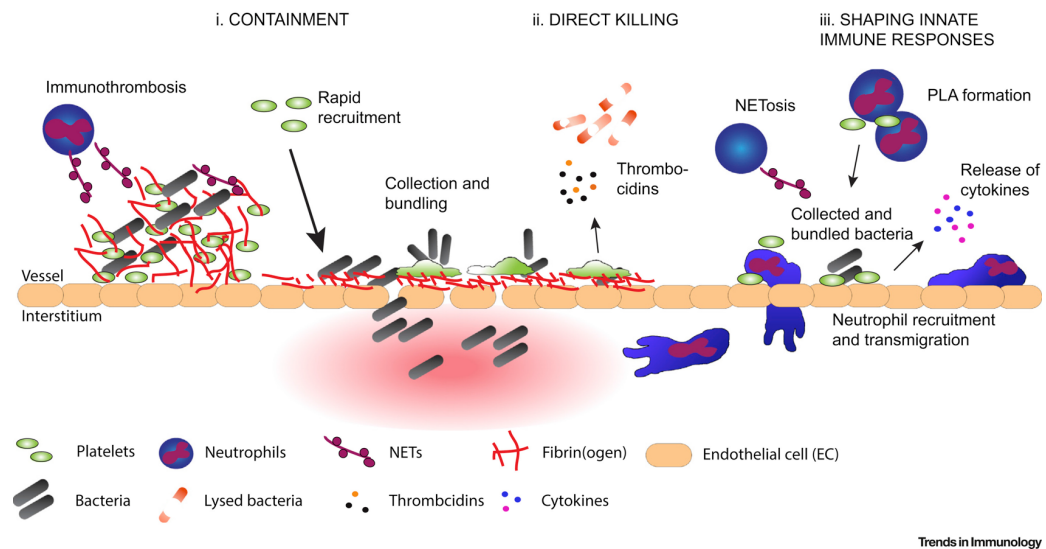


Abbildung 6: Schematische Darstellung der Interaktion von Thrombozyten mit Pathogenen

Thrombozyten unterstützen die Immunabwehr durch eine Vielzahl an Mechanismen. (i) Thrombozyten können im Rahmen der Immunothrombose und durch das Sammeln, Bündeln und Festhalten der Bakterien, Pathogene zurückhalten. Dies geschieht entweder direkt oder indirekt über das Brückenmolekül Fibrinogen. (ii) Durch die Ausschüttung von bakteriziden Proteinen aus ihren Granula sind sie in der Lage, Bakterien direkt abzutöten oder sie in ihrer Aktivität einzuschränken. (iii) Sie tragen aktiv zur Immunantwort bei, indem sie Leukozyten rekrutieren und aktivieren [72].

Mit freundlicher Genehmigung von Copyright Clearance Center, Elsevier, Copyright © 2019

3.1. Direktes Abtöten von Pathogenen

Thrombozyten besitzen ein Kontingent an antimikrobiellen Stoffen, die nach Aktivierung freigesetzt werden. Diese sogenannten Thrombozyten-mikrobizide-Proteine (PMPs) schließen Chemokine, Fibrinopeptide, Defensine und Thymosin β -4 ein und sind vorrangig in den Granula gespeichert [73]. Dabei zeigen die PMPs verschiedene Taktiken zur Bekämpfung von Pathogenen. Ihr Angriffsziel ist meist die Zellwand von Bakterien, die sie durch Strukturveränderung in ihrer Membranenergetik und Permeabilität beeinträchtigen [74]. Kationische Proteine von Thrombozyten von Kaninchen zeigen *in vitro* mikrobiostatische oder mikrobiozide Aktivität gegen *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*), *Escherichia coli* (*E. coli*) und *Candida albicans* [75]. Des Weiteren ist das Thrombin-induzierte-Thrombozyten-mikrobizide-Protein in der Lage *S. aureus* während seiner exponentiellen Wachstumsphase potent zu lysieren [76]. Außerdem reduzieren die Sekrete von aktivierten Thrombozyten die Zahl der adhärenenten Bakterien in einem *in vivo* Model zur infektiösen Endokarditis, bei

dem *Streptococcus sanguis* verwendet wurde [77]. Im gleichen Model konnte außerdem gezeigt werden, dass eine induzierte Thrombozytopenie, zu einer höheren Dichte der Streptokokken an den Herzklappen führt [78]. Die Thrombozidine (TC) TC-1 und TC-2 können *E. coli* und *S. aureus* durch einen Mechanismus unschädlich machen, der jedoch nicht zu einer Lyse der bakteriellen Zellwand führt und auf einen alternativen Prozess zur Abtötung von Pathogenen hinweist [79]. Dies zeigt mitunter, dass die molekulare Aktivität der PMPs noch nicht vollends aufgeklärt ist.

Neben der Ausschüttung von bakteriziden Stoffen besitzen Thrombozyten außerdem Phagozytose-ähnliche Fähigkeiten zur Bekämpfung von Pathogenen. Indem sich Thrombozyten kontinuierlich über den Bakterien ausbreiten, können sie Bakterien in ihre Vakuolen aufnehmen, die aus Kanälen des OCS bestehen [23].

3.2. Pathogen-Einschluss durch Thrombozyten

3.2.1. Immunothrombose

Während die Hämostase ein physiologischer Vorgang ist, der den Blutverlust nach einer Verletzung verhindert, wird die Thrombose traditionell als das pathologische Pendant dargestellt, das durch die Blutgerinnung und Thrombozytenaggregation zum Gefäßverschluss führt und im Zuge dessen durch die nicht mehr gewährleistete Organdurchblutung Gewebsschäden verursachen kann [2, 5].

Jedoch kann Thrombose auch in Assoziation mit einem physiologischen Prozess stehen, die sogenannte Immunothrombose, die vom angeborenen Immunsystem eingeleitet wird und eine Barriere für die Verbreitung von Pathogenen im Organismus darstellt [5]. Tatsächlich sind Thrombose und Hämostase von den beiden gleichen Kernprozessen abhängig: der Gerinnung, als deren Endprodukt Fibrin gebildet wird und der Aktivierung der Thrombozyten [80]. Zusätzlich sind bei der Thrombose zelluläre und molekulare Mediatoren (Neutrophile, Gewebefaktor) involviert. Dabei induzieren Immunzellen und thrombosespezifische Vermittlermoleküle eine physiologische Art von Thrombose in den Mikrogefäßen von Organen, z.B. den Sinusoiden der Leber und Milz. Diese Immunothrombose bringt eine lokale Plattform hervor, auf der Fibrin, Monozyten, Neutrophile und Thrombozyten gemeinsam zur

Pathogen-Identifizierung beitragen [2, 5, 81]. Neutrophile sondern neutrophile extrazelluläre Fallen (NETs) aus, die hauptsächlich aus DNA und Histonen bestehen und Bakterien einfangen und eliminieren können [82]. Dieser Prozess hilft, sowohl die Gewebseinwanderung und Ausbreitung von Bakterien zu unterdrücken als auch ihr Überleben zu mindern. Sie stellt also eine erste Barriere der Immunabwehr da, um eine Infektion lokal zu kontrollieren [2].

Während der Thrombusbildung kommunizieren und unterstützen sich die Thrombozyten und die Koagulationskaskade gegenseitig. Durch das Freisetzen von Koagulationsfaktoren oder Ko-Faktoren, wie die Phospholipide und durch die Sekretion von anorganischen Polyphosphaten können Thrombozyten sehr gerinnungsfördernd wirken [3]. Diese Polyphosphate beschleunigen die Aktivierung des Faktor V und Faktor XII, dessen Funktion für die Hämostase zwar unwesentlich ist, jedoch eine große Rolle sowohl in der Thrombose als auch in der Entzündung spielt. Mäuse, denen Faktor XII fehlt, zeigten *in vivo*, dass sich Bakterien verstärkt im Organismus ausbreiten konnten [4]. Die Gerinnung wiederum fördert die Thrombozytenaggregation und die Rekrutierung der Thrombozyten in das Fibringerinnsel. Generell tragen die Thrombozyten durch ihre wichtigen regulatorischen Funktionen zur Immunothrombose bei. Dies geschieht durch das Aufspüren und Abtöten von Bakterien, durch das Einfangen von Pathogenen mithilfe der Thrombusbildung und indem sie angeborene Immunzellen zu lokalen Infektionsherden locken. [5].

3.2.2. Direktes Binden von Pathogenen durch Thrombozyten

Auch außerhalb des Vorgangs der Immunothrombose sind Thrombozyten in der Lage, Pathogene an sich zu binden. Dabei können sie die Bakterien entweder direkt über einen Rezeptor oder über ein Brückenmolekül, z.B. Fibrin(ogen) binden [9, 72, 83]. Diesen Umstand machen sich vor allem bakterielle Virulenzfaktoren zunutze. *S. aureus* kann sich an das GPIIb-IIIa-Integrin der Thrombozyten via Fibrinogen und Clumping Faktor A binden, während er mithilfe seines Protein A den vWF nutzt, um sich an das GpIb-Integrin zu binden [84, 85]. Gram-negative Bakterien wie *E. coli* können Thrombozyten durch ihre Lipopolysaccharide aktivieren, die an den Toll-like-Rezeptor-4 der Thrombozyten binden und so zur Ausschüttung der Granula führen [86].

3.2.3. Bündeln von Bakterien durch Thrombozyten

Die Arbeitsgruppe um Gärtner *et al.* konnte kürzlich zeigen, dass Thrombozyten fähig sind, in Kapillaren zu wandern und dabei Bakterien zu bündeln [9].

Auf einem Deckgläschen, das mit Fibrinogen und verschiedenen Arten von Bakterien (*E. coli*, *S. aureus*, *L. monocytogenes*) beschichtet ist, sammeln die wandernden Thrombozyten *in vitro* die Bakterien auf und häufen sie am Pseudonukleus zusammen mit dem Fibrinogen an. MyH9-defiziente Thrombozyten, die nicht wandern können, sind dabei weniger effektiv im Sammeln und Bündeln der Bakterien (siehe Abbildung 7) [9].

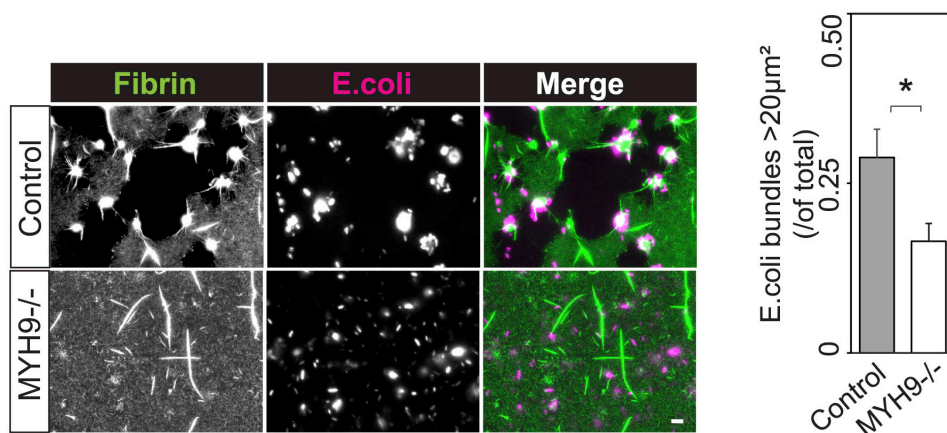


Abbildung 7: Wandernde Thrombozyten bündeln Bakterien effektiver

Während ihrer Wanderung auf einem Deckgläschen, das mit Fibrinogen (grün) und *E.coli* (Magenta) beschichtet ist, sammeln Thrombozyten die Bakterien auf und häufen sie zusammen mit dem Fibrinogen auf ihrem Pseudonukleus an. Die epifluoreszenzmikroskopische Aufnahme zeigt den Vergleich zwischen Wildtyp und MyH9-defizienten Thrombozyten, die weniger Bakterienbündel über einer Größe von 20 µm² ansammeln können [9].

Mit freundlicher Genehmigung von Copyright Clearance Center, Elsevier, Copyright © 2017

In einem Sepsis-Model in der Maus wurde *in vivo* gezeigt, dass mobile Thrombozyten ebenfalls mit Fibrin(ogen) und den daran gebundenen Bakterien interagieren und deutlich größere Bakterienaggregate in den Lebersinusoiden bilden, als Thrombozyten mit Migrationsdefizit (siehe Abbildung 8) [9].

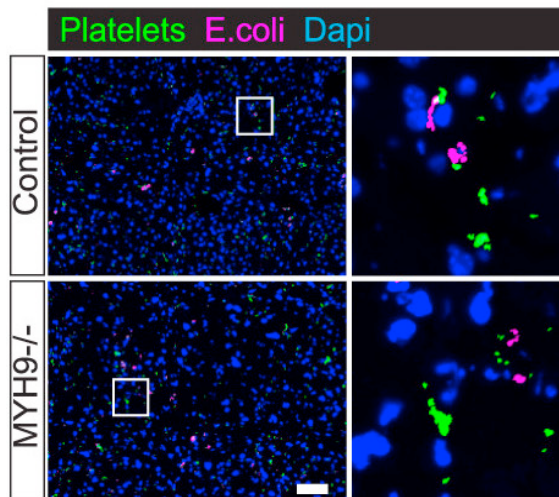


Abbildung 8: Thrombozyten bündeln Bakterien in der Leber

Darstellung repräsentativer Mikroskopaufnahmen von immunhistologischen Schnitten der Leber nach Infektion mit *E.coli*. Wildtyp-Thrombozyten (Grün) können effektiver Bakterien (Magenta) an sich binden und diese zu Aggregaten anhäufen als MyH9-defiziente Thrombozyten [9].

Mit freundlicher Genehmigung von Copyright Clearance Center, Elsevier, Copyright © 2017

In vitro wurde beobachtet, dass sich migrierende polymorphkernige Neutrophile (PMN), sobald sie auf Thrombozyten-geformte Bakterienbündel stoßen, verlangsamen, zum Stillstand kommen und Phagozytose betreiben. Außerdem setzen sie NETs frei, woraus geschlossen werden kann, dass es zu einer Aktivierung der PMNs durch die Thrombozyten-Bakterienbündel kommt. Wird die Thrombozytenmigration und das davon abhängige Bündeln der Bakterien durch den Einsatz MyH9-defizienter Thrombozyten unterbunden, resultiert dies in einer verringerten Formation von NETs. Diese Erkenntnisse konnten auch *in vivo* bestätigt werden. Im Rahmen einer Infektion, interagieren PMNs mit den Thrombozyten-Bakterienaggregaten und entlassen NETs in die Mikrogefäße der Leber von MRSA-infizierten Mäusen. Zu einer deutlich geringeren Ausbildung von NETs kommt es bei Pf4-Cre x MyH9^{flox/flox}-Knockout-Mäusen, was hinweisend dafür ist, dass die Bündelung der Bakterien von migrierenden Thrombozyten diese Prozesse unterstützt [9].

Durch diverse Mechanismen ist *S. aureus* in der Lage, die Phagozytose intrazellulär zu überleben. Er löst dadurch eine von den Neutrophilen ausgehende Zytolyse aus, bei der körpereigene Moleküle freigesetzt werden, die eine zum Teil schwerwiegende lokale Entzündung hervorrufen [87]. Dieser toxische Effekt der NETs kann auch in der Leber beobachtet werden [88]. Wird die Thrombozyten-

Migration außer Kraft gesetzt, reduziert dies nicht nur die Aktivität der Neutrophilen, sondern verringert auch den Leberschaden. Die bakterielle Clearance des *S. aureus* in der Leber ist dabei nicht beeinträchtigt [9].

4. Infektiöse Endokarditis

Die infektiöse Endokarditis (IE) ist eine infektiöse Erkrankung des Endokards, bei der am häufigsten die Herzklappen betroffen sind [89]. Nach Eintritt in den Blutfluss, strömen die Bakterien durch das Herz und adhären trotz der hohen Flussgeschwindigkeiten an den Herzklappen. Angeheftet am Endothel, rekrutieren sie Thrombozyten und Fibrin und formen sogenannte Vegetationen. Diese Vegetationen, die im Grunde infizierte Blutgerinnsel sind, schirmen die Pathogene vor den stetigen Angriffen des Immunsystems ab und bieten eine sichere Umwelt, in der sich die Bakterien vermehren können.

4.1. Pathophysiologie und Ätiologie der infektiösen Endokarditis

Die zugrundeliegende Ursache für das Auftreten und die Entwicklung einer IE ist häufig eine erkrankte Herzklappe und eine beschädigte Endothelschicht durch vorangegangene Krankheit oder Trauma [90-92]. Endothelzellen reagieren auf lokale Entzündungen, indem sie verschiedene Moleküle exprimieren. Bei Gewebsverletzung und daraus resultierender Präsenz von Thrombin, wird die Freisetzung des vWF aus den Weibel-Palade-Körperchen hochreguliert [93]. Dieser bindet wiederum Kollagen und vermittelt durch den GPIIb-Komplex die Adhäsion von Thrombozyten (siehe II.1.2) und Pathogenen [94]. Darüber hinaus exprimieren aktivierte Endothelzellen das interzelluläre Adhäsionsmolekül-1, an das die aktivierten Thrombozyten mit ihrem GPIIb/IIIa Rezeptor adhären können [95] und unter anderem Integrine der β 1-Familie [96]. Diese binden Fibronectin an die Oberfläche des Endothels. *S. aureus* und einige weitere Erreger der IE tragen auf ihrer Oberfläche Fibronectin-bindende-Proteine, mit denen sich die zirkulierenden Bakterien anheften können.

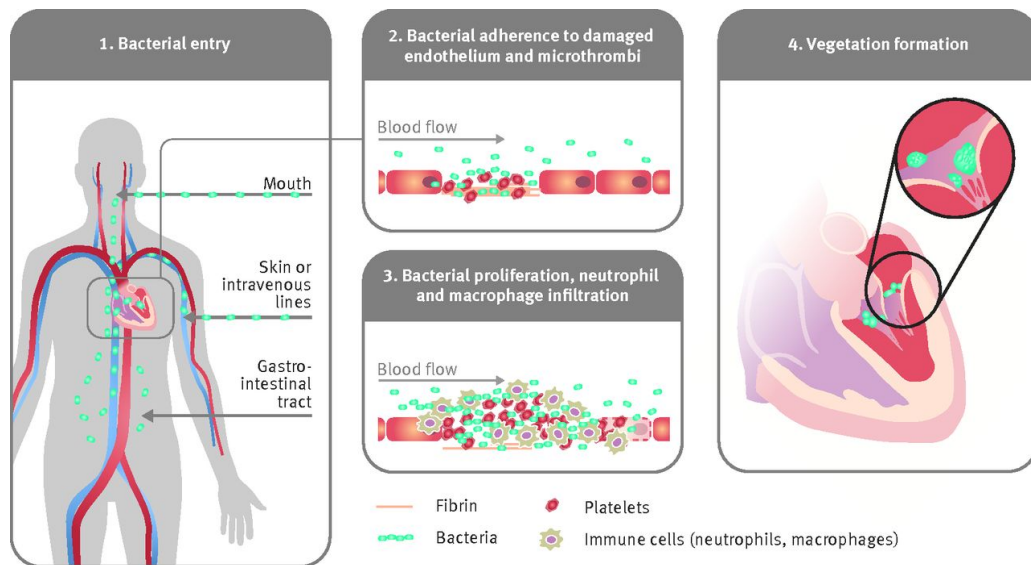


Abbildung 9: Infektiöse Endokarditis

(1.) Nach einer Infektion zirkulieren die Bakterien im Blut und erreichen die Herzklappe. (2.) Ist das Endothel der Herzklappe beschädigt, sind subendotheliale Matrixproteine dem Blutfluss ausgesetzt. Es kommt zur Anlagerung von Thrombozyten, Fibrinogen und Bakterien und zur Formung von Mikrothromben. Besonders *S. aureus* besitzt eine große Anzahl von Adhäsinen, mit denen er sich festsetzen und dem Shear Stress widersetzen kann. (3.) Es folgt die Infiltration weiterer Immunzellen in die Mikrothromben und (4.) die Ausbildung von Vegetationen [97].

Mit freundlicher Genehmigung von Copyright Clearance Center, BMJ Publishing Group Ltd., Copyright © 2017

Diese Mechanismen führen zu einer raschen Anlagerung von Fibrin, Thrombozyten und Bakterien (siehe Abbildung 9). Um Kontrolle über die Infektion zu gewinnen, exprimieren Monozyten und die aktivierten Endothelzellen TF, der die Koagulation weiter vorantreibt und zusätzliches Fibrin an die Vegetationen anlagert [98, 99]. Fibrin dient dabei als Plattform für zirkulierende Thrombozyten und Leukozyten, die die Inflammation verstärken [100]. Anstatt die Infektion jedoch einzudämmen, kreiert das Koagulationssystem ungewollt einen idealen Schutzmantel, der die Bakterien vor dem Immunsystem schützt. Histologische Untersuchungen zeigen, dass die Läsionen einer Endokarditis hauptsächlich aus umfangreichen Bakterienkolonien bestehen, die von Fibrin umgeben und häufig komplett frei von Leukozyten sind [101].

Bis zu 30% der IE-Fälle hängen mit der gesundheitlichen Versorgung zusammen [102]. Folglich stellen die strenge Einhaltung der Hygienevorschriften und steriles Arbeiten während interventionistischen Eingriffen eine essentielle Komponente der IE-Prophylaxe dar [103]. Die Prognose der Patienten ist vom Auftreten von

Komplikationen abhängig. Dazu zählen Leberversagen, Herzversagen mit kardiogenem Schock und Sepsis [104]. Herzklappenprothesen, degenerative Herzklappenerkrankungen, Drogenmissbrauch und die wachsende Zahl invasiver Behandlungsmethoden, wie die Implantation kardiologischer Geräte, stellen Risikofaktoren für die Entstehung einer IE dar [105]. Neben Streptokokken sind Staphylokokken, insbesondere *S. aureus*, an der mikrobiellen Besiedelung der Herzklappen beteiligt [106, 107].

4.2. Rolle der Thrombozyten bei der infektiösen Endokarditis

Die IE ist ein Paradebeispiel für die enge Verknüpfung zwischen der Hämostase und dem angeborenen Immunsystem [108]. Während sich die Bakterien in den Vegetationen vermehren, ist das Immunsystem nicht in der Lage, die Infektion zu kontrollieren. Da Leukozyten kaum in das Innere der Vegetationen vordringen können, sind Thrombozyten oft die einzigen Zellen, die im direkten Kontakt zu den Bakterien stehen [109]. Parallel zu Leukozyten, sind Thrombozyten vollwertige Immunzellen, die mit Pathogenen auf viele Weisen interagieren und sie sowohl immobilisieren als auch abtöten können (siehe II.3). In der Pathologie der IE kommt den Thrombozyten eine ambivalente Rolle zu. Anfänglich können Thrombozyten die Adhäsion der Pathogene an die Herzklappe vermitteln [110]. Im weiteren Verlauf stellen sie durch die Thrombozytenaggregation und ihre prokoagulatorische Wirkung zusätzliche Schutzbarrieren für die Bakterien dar und senken so außerdem die Empfindlichkeit der Bakterien gegenüber Antibiotika [111]. Andererseits weisen Studien an Ratten und Kaninchen darauf hin, dass sie in einer späteren Phase, zur bakteriellen Clearance beitragen [78, 112]. Mikroorganismen, die von Patienten mit IE isoliert wurden, waren stets resistent gegenüber den bakteriziden Stoffen der Thrombozyten [113]. Bakterienstämme, die von Patienten mit einer anderen Art von Infektion isoliert wurden, zeigten diese Resistenz nicht. Diese Beobachtungen legen die Annahme nahe, dass Pathogene, die mit einer IE assoziiert sind, gegen die bakterizide Wirkung der Thrombozyten resistent sein müssen, um den Vorteil des koagulierenden Effekts der Thrombozyten nutzen zu können.

4.3. Staphylococcus aureus

S. aureus ist ein grampositives Bakterium, das natürlicherweise in der humanen Mikroflora (Haut, Schleimhaut) vorkommt [114]. Es ist ca. 1 µm groß und gehört

zu den wichtigsten Erregern nosokomialer Infektionen. Etwa ein Drittel der Bevölkerung sind entweder permanent oder vorübergehend mit *S. aureus* besiedelt. Meist handelt es sich dabei um eine asymptomatische Besiedelung [115]. Ist die Immunabwehr des Wirtes jedoch geschwächt, kann es zu Krankheitserscheinungen kommen, die sich sehr vielseitig darstellen [116]. Neben lokalen, oberflächlichen Hautentzündungen (Furunkel, Karbunkel), können sich auch schwerwiegendere Infektionen wie Pneumonie, Sepsis, Osteomyelitis, Meningitis oder Endokarditis entwickeln. *S. aureus* ist für 75 % aller Haut- und Weichteilgewebeeinfektionen verantwortlich [117]. Hinsichtlich ihrer Sensibilität für β -Lactam-Antibiotika werden die Staphylokokken in Methicillin-sensible (MSSA) und Methicillin-resistente (MRSA) Stämme eingeteilt. Eine hohe Anzahl an Krankenhausinfektionen wird durch MRSA verursacht. Die Resistenz gegenüber β -Lactam-Antibiotika wird durch das zusätzliche Penicillin-Bindeprotein (PBP2a) verursacht. β -Lactam-Antibiotika, die normalerweise das Penicillin-Bindeprotein blockieren und so die Zellwandsynthese der Bakterien stören, haben für das PBP2a eine verminderte Affinität. Die Zellwandsynthese der Bakterien kann demzufolge ungehindert ablaufen und die Bakterien werden nicht abgetötet. Das PBP2a wird auf einem zusätzlichen Gen (*mecA*) codiert, das Bestandteil eines Genelements, des staphylococcal cassette chromosome *mec* (SCC*mec*-Element) ist. Durch die Kassettenchromosom Remkombinasen *ccrA* und *ccrB* wird das SCC*mec*-Element in das Chromosom von weiteren *S. aureus* Bakterien integriert und die Resistenz breitet sich aus [118].

4.3.1. Virulenzfaktoren des *Staphylococcus aureus*

Der essentielle erste Schritt in der Entwicklung einer Herzklappeninfektion ist die Interaktion des Pathogens mit der Endothelschicht. Der hohe Blutfluss an den Herzklappen erzeugt beträchtliche Scherkräfte, die die Adhärenz der Bakterien an das Endothel erheblich beeinträchtigen. Besonders *S. aureus* induziert eine starke Bindung an geschädigtes, entzündetes Gewebe und die extrazelluläre Matrix. Dies gelingt ihm durch seine hohe Vielfalt an verschiedenen adhäsiven Proteinen (Adhäsiven). Diese sind entweder kovalent zur Zellwand gebunden („microbial surface components reorganizing adhesive matrix molecules“, MSCRAMMs) [119] oder werden sezerniert und an die Zelloberfläche zurückgebunden („secretable expanded repertoire adhesive molecules“, SERAMs) [120]. Zu den MSCRAMMs gehören unter anderem die Fibronektinbindenden-Proteine (FnBPs)

und das Fibrinogen-bindende Protein Clumping Factor A (ClfA) [121, 122]. Die FnBPs begünstigen die Adhäsion des *S. aureus* zu noch unbeschädigtem Endothel, indem sie via Fibronectin an das Integrin $\alpha 5 \beta 1$ binden [123-125]. Der Komplex aus ClfA und des vom *S. aureus* sezernierten Von-Willebrand-Faktor-bindenden Proteins (vWbP), bindet an den vWF und vermittelt damit die Verankerung des *S. aureus* zum entzündeten und beschädigten Endothel unter Shear Stress [121]. Außerdem sind Wandteichonsäuren an der bakteriellen Adhäsion beteiligt [126, 127].

S. aureus hat eine Vielzahl an Mechanismen entwickelt, Thrombozyten zu manipulieren. Die Bindung von *S. aureus* an Thrombozyten wird durch Proteine wie Fibrinogen/Fibrin, vWF oder Fibronectin und einigen MSCRAMMs mediiert [85]. Während dieses Prozesses sind der Thrombozyten Fc Rezeptor Fc γ RIIa und das Thrombozyten Integrin α IIb β 3 involviert [128, 129]. Das extrazelluläre adhärente Protein (Eap) kann Thrombozyten durch Stimulation der Thiol Isomerase aktivieren [130] und bindet mononukleäre Zellen des peripheren Bluts. Zudem veranlasst Eap die Freisetzung des proinflammatorischen Tumornekrosefaktor, der die Anhaftung des *S. aureus* an die Endothelzellen bewirkt [131]. Superantigene, wie das Enterotoxin C oder das Toxischer-Schock-Toxin-1 stimulieren die Freisetzung von Zytokinen durch Endothelzellen, T-Zellen, B-Zellen, Makrophagen und dendritischen Zellen. Hohe Zytokinspiegel verschlimmern den Krankheitsverlauf beträchtlich, da sie zu größeren Vegetationen und Bakterienzahlen führen [132-134].

Nach der Kolonisierung der Klappen, kann *S. aureus* in den meisten Fällen überleben und die körpereigene Immunabwehr umgehen. Ein Schlüsselereignis in diesem Prozess ist die Induktion des Koagulationssystems. Staphylokokken können die Produktion von TF durch lokale Monozyten [135] auslösen und dadurch die Thrombozytenaggregation in Gang bringen [136, 137]. Seine Fähigkeit, Fibrin zu erzeugen und Blut zu koagulieren, ist eine wichtige Eigenschaft des *S. aureus* und unterscheidet ihn von weniger virulenten Pathogenen. Dies erreicht er zusätzlich durch die Sekretion von Staphylokoagulase (Coa) und des vWFbp. Fibrin ist essentieller Bestandteil für die Formation von Biofilmen, ein weiterer hoch virulenter Faktor des *S. aureus*, durch den er es schafft, die Immunantwort zu umgehen und im Organismus zu persistieren [138].

4.4. Biofilmformation

Biofilme sind allgemein definiert als eine Gemeinschaft an Zellen, die in extrazelluläre Matrix eingebettet und an eine Oberfläche gebunden sind [8]. Bei der Bildung eines Biofilms setzt *S. aureus* seine Virulenzfaktoren optimal ein: Nach der Adhäsion am Endothel durch seine MSCRAMMs, hüllt er sich durch die vielfältige Induktion der Koagulation in einen Schutzmantel aus Fibrin und Thrombozyten (siehe II.4.3.1). Durch diese Biofilmformation können sich die Bakterien sowohl vor der körpereigenen Immunantwort als auch vor der Therapie durch Antibiotika schützen [7]. Sie gelten daher als Therapie-resistenter als einzelne Bakterienkolonien und werden mit der Persistenz von chronischen Infektionen in Verbindung gebracht [8]. Zusätzlich treten Biofilme häufig in Körperbereichen auf, die für Behandlungen schwer zugänglich sind [139]. Staphylokokken stellen einen Großteil der Biofilm-basierten Infektionserreger dar und sind ein großes Problem des Gesundheitswesens. Ca. 80 % der humanen Infektionen basieren auf Biofilmen [140], wobei *S. aureus* als Haupterreger bei Krankenhausinfektionen, wie der Infektion von Wunden und Implantaten, gilt [141].

4.4.1. Lebenszyklus eines Biofilms

Der Lebenszyklus eines Biofilms besteht aus drei Phasen (siehe Abbildung 10). Zuerst setzt sich das Pathogen an einer abiotischen oder biotischen Oberfläche fest. Anschließend reift der Biofilm heran, bis er schließlich streut [142]. Das Festsetzen erfordert bakterielle Adhäsine (siehe II.4.3.1), während die Heranreifung durch Zell-Zell-Adhäsionen vermittelt ist. Die Streuung und der Abbau des Biofilms werden durch Enzyme hervorgerufen. Diese werden entweder vom Bakterium selbst produziert oder befinden sich in der Umwelt [143]. Beim *S. aureus*-Biofilm folgt der Adhäsion und anfänglichen Vermehrung die Streuung eines geringen Teils der Zellen (Exodus). Kleine Bakterienherde verbleiben jedoch an der Oberfläche und entwickeln sich zu ausgereiften Biofilmen heran, die eine Turm-Struktur aufweisen [144].

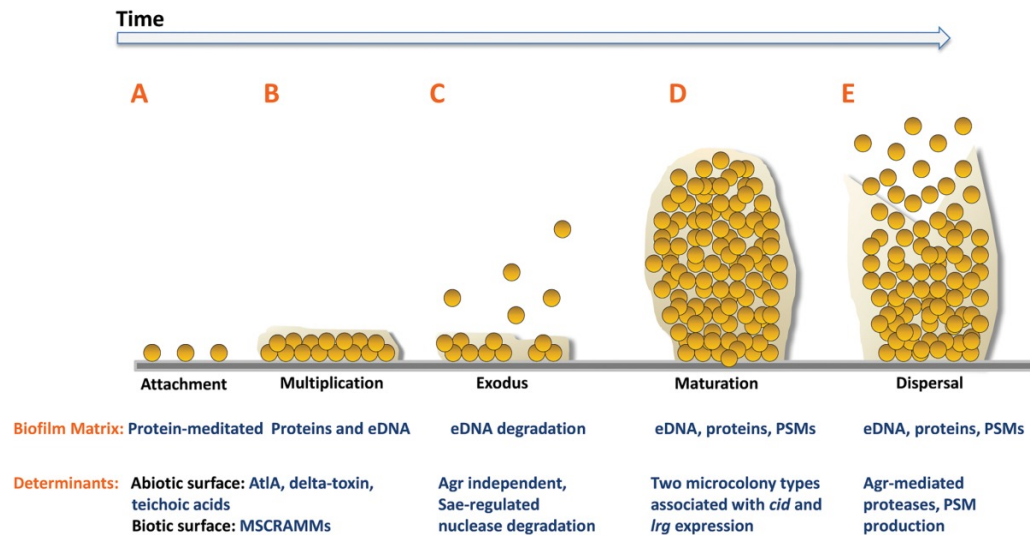


Abbildung 10: Lebenszyklus Biofilm

Die Bakterien heften sich an die Oberfläche an und vermehren sich. Anschließend kommt es zur Streuung eines geringen Teils der Bakterien (Exodus), kleinere Bakterienherde bleiben jedoch zurück. Diese Herde vermehren sich und formen einen ausgereiften Biofilm [145].

Mit freundlicher Genehmigung von Copyright Clearance Center, John Wiley and Sons Ltd, Copyright © 2017

4.4.2. Matrix und Struktur des Biofilms

Die Matrix des *S. aureus*-Biofilms ist eine komplexe, gelartige Substanz, die die Zellen des Biofilms umgibt und aus toten Neutrophilen, lysierten Bakterien, Polysacchariden und extrazellulärer DNA besteht [146, 147]. Die Matrix spielt eine große Rolle bei der Befestigung des Biofilms, der strukturellen Integrität und Reifung und wirkt als eine Art Kapsel, die die Proliferation des Biofilms unterstützt und die Zellen zusammenhält [148-152].

In der Struktur des ausgereiften Biofilms befinden sich weniger fest adhärierende, freie planktonische Zellen nahe an der Oberfläche. Von dort aus können diese streuen und andere Organe besiedeln. Tiefer in der Struktur sitzt die große, metabolisch weniger aktive Masse an Bakterien, die sogenannten Persisterzellen [153]. Diese Persisterzellen schützen vor Immunzellen und Antibiotika und haben die Aufgabe, den Biofilm zu erhalten, wiederaufzubauen und zu reorganisieren. Die modifizierte Mikroumwelt innerhalb des Biofilms und die Hochregulierung der mikrobiellen Stressgene tragen ebenfalls zur Resistenz gegenüber antimikrobiellen Therapien bei. Dies wird innerhalb der Kolonie durch chemische Zell-zu-Zell Kommunikation, das sogenannte Quorum sensing, koordiniert. *In vitro* konnte gezeigt werden, dass *S. aureus* in einem Biofilm höhere Toleranz

gegenüber Antibiotika zeigt, als seine planktonischen Zellen [7]. Innerhalb des Biofilms befinden sich die Bakterien oft in einem Komplex mit Thrombozyten. Während die Vegetationen durch die Anlagerung weiterer Thrombozyten und Fibrin wachsen, schließen sie Bakterienkolonien ein [154]. Der Biofilm besteht daher aus Lagen von Thrombozytenaggregaten und darin eingebetteten Bakterieninseln. Die Pathogen-Thrombozyten Interaktionen sind damit bestimmender Faktor bei der Bildung und beim Wachstum des Biofilms [155] und sind mit der Anlagerung von Fibrin verknüpft [124]. Die Fähigkeit des *S. aureus*, Thrombozyten zu aktivieren und die Thrombozytenaggregation zu induzieren [156], hat die Bildung eines mehrschichtigen Biofilms zur Folge.

4.5. Therapie der infektiösen Endokarditis

Trotz optimaler medizinischer Versorgung, endet die IE in 30% der Fälle tödlich [157]. Im Gegensatz zu anderen infektiösen kardiovaskulären Krankheiten, hat sich an der hohen Mortalitätsrate in den letzten Jahrzehnten nichts geändert.

Wie bereits erwähnt (siehe 4.4), sind Organismen in Biofilmen aufgrund ihrer eingeschränkten Durchlässigkeit und ihres stationären Wachstums grundsätzlich resistenter gegenüber antimikrobiellen Therapien. Die aktuelle Behandlungsstrategie besteht aus der Gabe von hoch dosierten Antibiotika über einen längeren Zeitraum. Jedoch gibt es derzeit kein antimikrobielles Mittel, das tief genug eindringen und die bakterizide Wirkung im Biofilm zuverlässig entfalten kann [158].

Neue pharmakologische Strategien zielen auf die Phasen der Biofilmentwicklung und zeigen Erfolge in der Behandlung von chronischen Biofilm-Wundinfektionen [159]. Sie greifen die Adhäsion, die Formation der extrazellulären Matrix, das Quorum sensing und die Streuung an [160].

Da die Interaktionen zwischen Bakterien, Thrombozyten und dem Koagulationssystem maßgeblich an der Bildung und Proliferation des Biofilms beteiligt sind, wurden einige Studien durchgeführt, die den Effekt der antithrombotischen Therapie untersucht haben [78, 161, 162]. Bedenkt man die ambivalente Rolle der Thrombozyten bei der IE, überrascht es nicht, dass die Ergebnisse inkongruent sind [109]. Präklinische Untersuchungen an Ratten weisen zwar darauf hin, dass antithrombotische Mittel, besonders α Ib β 3-Antagonisten, vor einer IE schützen können, sind aber auf lange Sicht für

den klinischen Gebrauch untauglich [163, 164]. Besonders in Hinblick auf Nebenwirkungen in Form von Blutungen, muss die antithrombotische Therapie gut gegen den Nutzen abgewogen werden und bedarf weiterer Forschung [109].

Die beste Aussicht auf Heilung bietet oft die Entfernung des Biofilms. Dabei ist es besonders wichtig, während der Operation jegliches infizierte und nekrotische Gewebe zu entfernen. Die peri- und postoperative Gabe von Antibiotika, gegen das das Pathogen empfindlich ist, ist dabei sehr wichtig. Verbleibende planktonische Zellen müssen abgetötet werden, bevor sie die Chance bekommen, einen neuen Biofilm zu bilden [165].

III. ZIELSETZUNG

Neue Erkenntnisse zeigen die Beteiligung der Thrombozyten an verschiedenen immunologischen Prozessen auf und erweitern damit ihre klassische Rolle während der Hämostase und Thrombose. Erst kürzlich konnte von Gärtner *et al.* gezeigt werden, dass Thrombozyten unter Aufwendung Aktomyosin-abhängiger Kräfte in den Kapillaren der Leber aktiv migrieren können. Über das Matrixmolekül Fibrin interagieren sie dabei mit Bakterien, bündeln diese und unterstützen dadurch die Immunantwort [9]. Die Fibrin-vermittelte Bildung von Thrombozyten-Bakterien-Aggregaten könnte auch bei weiteren (patho)physiologischen Prozessen eine Rolle spielen. Zur eingehenden Untersuchung wurde in dieser Arbeit der Biofilm gewählt, der sich pathophysiologisch im Rahmen einer IE an der Herzklappe bildet und hauptsächlich aus Fibrin, Thrombozyten und Bakterien besteht. Ziel dieser Arbeit ist es, die Rolle der Kontraktilität von Thrombozyten hinsichtlich der Interaktionen mit *S. aureus* in einem dreidimensionalen Fibrinnetzwerk zu untersuchen und Aufschlüsse über ihre Beteiligung bei der Formation und Struktur eines Biofilms zu erhalten.

Durch fluoreszenzmikroskopische Analysen eines dreidimensionalen Gerinnsels soll die Strukturierung des Fibrinnetzwerkes und der darin enthaltenen Bakterien *in vitro* untersucht werden. Durch die Hemmung der kontraktilen Kräfte von Thrombozyten anhand para-Nitroblebbistatin, soll außerdem die Bedeutung der Kontraktilität von Thrombozyten bei der Interaktion mit *S. aureus* im Fibrinnetzwerk evaluiert werden.

Des Weiteren könnte die Strukturierung des Fibrins und die Interaktion mit Bakterien durch Thrombozyten die bakterielle Clearance nach einer Infektion beeinflussen. Dazu soll oben genannter Versuch durch ein Pumpsystem erweitert werden. Gerinnsel mit Kontraktions-gehemmten Thrombozyten und intakten Thrombozyten sollen einem Fluss ausgesetzt werden. Durch Quantifizierung der Bakterienmenge vor und nach Fluss soll geklärt werden, ob die Kontraktilität der Thrombozyten unter Fluss-Bedingungen bei der Immobilisierung von Bakterien eine Rolle spielt. Zusätzlich soll ein Transmigrationsassay etabliert werden, der

die Bedeutung der Immobilisierung von Bakterien unter statischen Bedingungen beleuchtet.

Anhand einer lebend/tot Färbung der Bakterien in den Gerinnseln soll außerdem erforscht werden, inwieweit die Kontraktilität von Thrombozyten die Effizienz ihrer bakteriziden Wirkung beeinflusst.

In vivo soll die Relevanz der Kontraktilität von Thrombozyten bei der Formation eines Biofilms am Beispiel der IE untersucht werden. Hierfür wird ein Maus-Modell verwendet, bei dem das Endothel der Aortenklappe durch einen Faden verletzt wird. In diesem Rahmen soll die Methode durch die Etablierung einer Echokardiographie-Kontrolle erweitert werden. Durch anschließende Infektion der Mäuse mit *S. aureus* soll die Bildung eines Biofilms an der geschädigten Herzklappe provoziert werden. Anhand einer Knockout-Maus mit MyH9-defizienten Thrombozyten soll mithilfe der Immunhistochemie der Einfluss der kontraktilen Kräfte von Thrombozyten bei der Formation, Größe und Struktur des Biofilms aufgeklärt werden.

IV. MATERIAL UND METHODEN

1. Versuchstiere

Sowohl die *in vitro* als auch die *in vivo* Versuche wurden am Versuchstier Maus (*Mus musculus*) durchgeführt. Durch ihre geringe Körpergröße ist die Maus gut zu handhaben, beansprucht außerdem nur wenig Platz und ist daher sehr kostengünstig in der Haltung. Zudem eignet sie sich aufgrund ihrer kurzen Reproduktionszeit und der hohen Wurfgröße gut als Versuchstier. Die Physiologie der Maus ist gut erforscht und viele Versuchsmodelle in der biomedizinischen Forschung wurden unter anderem wegen der hohen genetischen Übereinstimmung mit dem humanen Genom an der Maus etabliert. Zudem steht eine große Anzahl an transgenen Knock-Out-Stämmen zur Verfügung. Um den Einfluss der mechanischen Kräfte der Thrombozyten bei der Immunabwehr zu untersuchen, wurden folgende Linien verwendet:

- C57BL/6J
- Pf4-Cre x MyH9^{fl/fl}

1.1. Wildtypstamm C57BL/6J

Der Wildtypstamm C57BL/6J ist ein Inzuchtstamm, auf dessen genetischem Hintergrund die hier verwendeten Pf4cre x MyH9^{fl/fl}- Mäuse gezüchtet wurden. Die für diese Versuche verwendeten Mäuse stammen von Charles River Laboratories.

1.2. Pf4-Cre x MyH9^{fl/fl}

Der Linie Pf4-Cre x MyH9^{fl/fl} ist ein transgener Stamm, bei dem das MyH9-Gen in den Megakaryozyten spezifisch inaktiviert wird.

Das Myosin-heavy-chain9 (MyH9) Gen kodiert für die non muscle myosin heavy chain, die die einzige Isoform der schweren Kette (Heavy Chain) des Myosins in Thrombozyten darstellt. Durch die schwere Kette bündelt sich das aktivierte Myosin in kurze Fasern und interagiert hauptsächlich mit zentralen Aktinfasern. Thrombozyten, die von den Megakaryozyten freigesetzt werden, weisen ein nahezu uneingeschränktes Fehlen des Myosins auf. MYH9-defiziente-Thrombozyten können zwar Lamellipodien bilden, jedoch keine kontraktilen

Aktomyosin-Bündel, die sogenannten Stressfasern [166, 167]. Diese spielen jedoch eine grundlegende Rolle bei Prozessen der zellulären Formänderung und Bewegung [168]. Thrombozyten dieses Mausstammes sind daher weder zur Zellmigration noch zur Retraktion von Fibringerinnseln fähig.

Dies resultiert außerdem in Makrothrombozytopenie, unreifen Thrombozyten und einer stark beeinträchtigten Kontraktilität der Thrombozyten. Die primäre Hämostase wird dadurch massiv gestört und die Folge sind eine erhöhte Blutungsneigung und geminderte Thrombusausbildung und -stabilität.

Die Aggregations- und Sekretionsfähigkeit der Thrombozyten hingegen sind kaum beeinträchtigt [167].

2. Tierhaltung und Hygienemanagement

Die Tiere der Linie Pf4cre x MyH9^{fl/fl} stammen aus eigener Zucht und wurden im Zentrum für Neuropathologie und Prionforschung (ZNP) unter SPF-Bedingungen (Specific Pathogen Free) gezüchtet. Sie wurden abhängig ihrer Körpergröße, Geschlecht und Verträglichkeit in Gruppen von zwei bis vier Tieren pro Käfig (THKB-M2V-M Polysulfonkäfig Typ M II, verlängert) gehalten. Die Käfige wurden an ein IVC-System (Individually Ventilated Cabinet) angeschlossen. Als Einstreu wurde entkeimtes, grobes Weichholzgranulat (Firma Abbed Nestbaumaterial) verwendet. Den Mäusen standen ad libitum sowohl ein Standardfutter für Labornager (#1320 Ratte/Maus Haltungsdiät, Altromin, Lage) als auch autoklaviertes Wasser, das in Trinkflaschen angeboten wurde, zur Verfügung. Als Enrichment dienten Kosmetiktücher (facial tissues supersoft, Wepa Professional GmbH, Arnsberg) zum Nestbau und eine rot getönte, hängende Kunststoffröhre als zusätzliches Beschäftigungsmaterial. Die zugekauften Tiere des Wildtypstammes C57BL/6J wurden im Walter-Brendl-Zentrum in Makrolon Käfigen vom Typ II long (Greenline IVC SealsavePLUS, Techniplast, Buguggiate, Italy) in einem IVC System untergebracht. Nach Ankunft wurde den Tieren eine Eingewöhnungszeit von mindestens drei Tagen gewährt, bevor sie in den Versuch gingen. Auch diese Mäuse hatten unbegrenzten Zugang zu Futter (Sniff Spezialdiäten GmbH, Soest) und Wasser aus Trinkflaschen. Die Käfige enthielten Enrichment in Form von Papphäusern, Kosmetiktüchern und Holzwolle zum Nestbau. Unter einer Käfigwechselstation (Techniplast, Varese, Italy) wurden die Mäuse wöchentlich in frische,

autoklavierte Käfige umgesetzt. Es erfolgte eine tägliche Kontrolle der Tiere. Ein beständiges Mikroklima innerhalb der Käfige wurde durch eine Gebläseeinheit (SmartFlow, Techniplast) gewährleistet, bei einer relativen Luftfeuchtigkeit von 55 (+/- 5) % und einer Temperatur von durchschnittlich 22 (+/- 1) °C. Der Zugang zur Tierhaltung war nur berechtigtem Personal vorenthalten, das vor dem Eintritt in die Haltung eine Schleuse durchlaufen musste. Ein fallender Druckgradient diente der Vorbeugung vor eingeschleppten Keimen. Die Geringhaltung der Keim- und Stressbelastung der Tiere hat großen Einfluss auf deren Gesundheitszustand und ist ein wichtiger Faktor zur Standardisierung der Tierversuche.

3. Narkose

Die Narkose setzte sich aus einer Kombination aus einleitender Inhalationsnarkose und anschließender Triple-Injektionsnarkose zusammen.

Zur Einleitung der Narkose wurden die Mäuse in einen Plastikzylinder verbracht, der an einer Seite an einen Isofluranverdampfer (OhmedaIsotec 3, Fa. Eickmeyer, Tuttlingen) und an der anderen Seite an eine Absaugevorrichtung angeschlossen war. Durch die Inhalationsnarkose aus 5,0 Vol % Isofluran (Isofluran CP, cp pharma, Burgdorf) und Sauerstoff als Trägergas wurde die Stressbelastung der Tiere auf ein Minimum reduziert. Isofluran stammt aus der Gruppe der Flurane und ist ein volatiles Anästhetikum. Es wirkt muskelrelaxierend und hypnotisch, wobei es kaum einen analgetischen Effekt erzielt. Aufgrund seiner niedrigen Metabolisierungsrate von 0,2 % wird das Isofluran rasch wieder abgeatmet.

Nachdem der Stellreflex erloschen und die Atmung verlangsamt war, wurde die Maus aus der Röhre genommen und intraperitoneal mit einer 30G Kanüle (BD Mikrolance Becton Dickson GmbH, Franklin Lakes, USA) und einer 1 ml Spritze (Injekt-F, B.Braun, Melsungen) die Injektionsnarkose appliziert. Dabei wurde die Maus leicht kopfüber gehalten, um die Organe im Abdomen vor zu verlagern und weder die Blase noch den Darm zu perforieren. Die vollständig antagonisierbare Injektionsnarkose bestand aus den drei Wirkstoffen Metedomidin, Midazolam und Fentanyl. Diese Kombination bietet einen synergistischen Effekt und eine gute Steuerbarkeit.

Medetomidin (Dorbene, Pfizer GmbH, Berlin) ist ein α_2 -Agonist, der sedierend und muskelrelaxierend auf das zentrale Nervensystem wirkt. Es wurde mit einer Dosierung von 0,5 mg/kg eingesetzt.

Midazolam (Midazolam, B. Braun, Melsungen) stammt aus der Gruppe der Benzodiazepine. Es bindet an GABA_A-Rezeptoren am limbischen System und wirkt sedativ, anxiolytisch und muskelrelaxierend. Die verwendete Dosis betrug 5,0 mg/kg.

Fentanyl (Fentadon, Albrecht GmbH, Aulendorf) ist ein synthetisches Opioid und wirkt als Agonist am μ -Opioidrezeptor. Es hat eine stark analgetische Wirkung und wird daher mit einer Dosierung von 0,05 mg/kg perioperativ zur Schmerzausschaltung verwendet.

Nach der Injektion der Anästhetika, wurde den Mäusen eine Augensalbe (Bepanthen Augen- und Nasensalbe, Bayer, Leverkusen) zur Befeuchtung der Hornhaut aufgetragen. Anschließend wurden die Tiere in eine Schlafbox gelegt, um sie vor äußeren Reizen abzuschirmen. Nach ca. 15 Minuten wurde der Zwischenzehenreflex kontrolliert und somit die chirurgische Toleranz sichergestellt. Während der Operation wurde der Zwischenzehenreflex engmaschig geprüft und bei Bedarf eine halbe Dosis der Injektionsnarkose nachgegeben. Während der kompletten Narkosedauer lagen die Tiere auf Wärmematten (ThermoLux-Wärmematte, Fa. Dehner, Rain (Lech)), um die Körpertemperatur aufrechtzuerhalten und einem Auskühlen der Tiere vorzubeugen.

Die Narkose wurde nach dem Eingriff mit den Wirkstoffen Atipamezol (Alzane, Zoetis Deutschland GmbH, Ulm; Dosierung 2,5 mg/kg) als α_2 -Adrenozeptor-Antagonist und Flumazil (Flumazenil, Hikma Pharma GmbH, Gräfelfing; Dosierung 0,5 mg/kg), als Benzodiazepin-Antagonist, kompetitiv antagonisiert. Fentanyl hat eine Wirkungsdauer von 20-30 Minuten und muss deshalb nicht antagonisiert werden, ist daher jedoch nicht als postoperatives Analgetikum geeignet. Zur postoperativen Schmerzabdeckung wurde subkutan das Opiat Buprenorphin (Buprenovet, Bayer Vital GmbH, Leverkusen) in der Dosierung

0,1 mg/kg verabreicht. Da die Wirkung erst nach etwa 30 Minuten eintritt, wurde es eine halbe Stunde vor dem Aufwachen der Tiere injiziert. Die Wirkdauer beträgt 8-10 Stunden.

4. Blutentnahme Methoden

4.1. Intrakardiale Blutabnahme

Für die intrakardiale Blutabnahme wurde die Maus wie beschrieben in Narkose gelegt und auf dem Rücken liegend mit Klebestreifen an den Extremitäten fixiert. In Höhe des ersten Interkostalraums wurde mit einer Schere die Haut entfernt, um freie Sicht auf die Rippen zu bekommen. Mit einer 2 ml Spritze (BD Discardit II Becton Dickson GmbH, Franklin Lakes, USA), die mit 145 µl Acid-Citrate-Dextrose (ACD) gefüllt war und einer 27G Kanüle (BD Mikrolance, Becton Dickson GmbH, Franklin Lakes, USA) wurde im 45°-Winkel links vom Sternum und zwischen der ersten und zweiten Rippe eingestochen und gleichzeitig vorsichtig aspiriert. Es wurde darauf geachtet, keinen starken Unterdruck aufzubauen und nur langsam zu aspirieren, um die empfindlichen Thrombozyten nicht vorzeitig zu aktivieren. Mit dieser Blutentnahmemethode können bis zu 1,5 ml Blut von der Maus abgenommen werden. Anschließend wurde die Maus unverzüglich durch zervikale Dislokation getötet.

4.2. Blutentnahme über die *Vena facialis*

Für die Gewinnung kleinerer Blutvolumina zur Analyse der Thrombozytenzahl wurde Blut aus der *V. facialis* abgenommen. Bei dieser Methode können abhängig vom Körpergewicht bis zu 300 µl Blut gewonnen werden. Die Tiere wurden wie oben beschrieben in Narkose gelegt. Nach Erlöschen der Reflexe wurden die Mäuse im Nacken fixiert und so das Blut in der *V. facialis* gestaut. Die Vene wurde mit einer Blutlanzette (Solofix, B. Braun Melsungen AG, OPM, Melsungen) punktiert, indem 3-4 mm kaudodorsal des Haarwirbels am Unterkiefer, 4-5 mm tief kurz eingestochen wurde [169]. Das Blut wurde mit einer EDTA- Küvette (Microvette 100 K3E, Sarstedt AG & Co, Nümbrecht) aufgefangen. Der Stau wurde anschließend gelöst und zur Blutstillung wurde mit einem Wattestäbchen einige Sekunden auf die Einstichstelle gedrückt.

5. Bakterien

5.1. Bakterienanzucht

Im Vorfeld wurde eine Brain-Heart-Infusion-Bouillon (BHI) als Anzuchtmedium hergestellt. Dafür wurde 37 g BHI Agar (Brain-Heart-Infusion Broth, Sigma Aldrich) in einem Liter destilliertem Wasser gelöst und anschließend autoklaviert.

Als Bakterium wurde *S. aureus* (USA300, Newman, Clinical Strain) verwendet, der gefroren bei -80 °C in BHI-Medium mit 40 % Glycerol gelagert war. Zur Anzucht wurde eine Übernacht-Kultur angesetzt. Dafür wurde das Kryoröhrchen mit dem *S. aureus* kurz angetaut und die Bakterienkultur mit einer sterilen Einmal-Öse (VWR) angekratzt. Ein belüftbares 14 ml Rundbodenröhrchen (14 ml Rundbodenröhrchen, Polypropylen; FALCON Corning Incorporated, Corning, NY, USA) wurde daraufhin mit 5 ml BHI gefüllt, mit der Öse beimpft und über Nacht bei 37°C und 220 rpm (rounds per minute) in einen Schüttelinkubator (Lab-Therm/Shaker, Modell Kühner, B.Braun Melsungen AG, Germany) gestellt. Am nächsten Morgen wurde die optische Dichte (OD) der Übernachtskultur bei 600 nm (OD₆₀₀) mit einem Photospektrometer (BioPhotometer 6131, Eppendorf, Hamburg) gemessen.

5.2. Wachstumskurve

Um die Kolonie-bildenden Einheiten („Colony-forming unit“, CFU) der Bakterienkultur durch die Messung der OD₆₀₀ bestimmen zu können, wurde im Vorfeld für jeden verwendeten Keim eine Wachstumskurve erstellt. Hierfür wurde eine Übernachtskultur angesetzt und am nächsten Morgen die OD₆₀₀ gemessen und auf einen Ausgangswert von OD₆₀₀ = 1,6 eingestellt. Davon wurden 100 µl in einen mit 50 ml BHI gefüllten Erlenmeyerkolben überführt. Die Kultur wurde gut geschwenkt und zu definierten Zeitpunkten jeweils 1 ml davon in ein 1,5 ml Eppendorf-Gefäß (Eppendorf Tubes, Eppendorf AG, Hamburg) pipettiert. Der Kolben mit der Kultur wurde daraufhin bei 220 rpm und 37°C in einen Inkubationsschüttler gestellt. Anschließend wurde die OD₆₀₀ des entnommenen Milliliters gemessen und eine Verdünnungsreihe erstellt. Jeweils 200 µl dieser Verdünnung wurden auf eine BHI-Agarplatte (Hirn-Herz-Agar-Platten, Biomerieux) ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert. Dieser Vorgang wurde alle 30 Minuten wiederholt, bis die Kultur übersättigt und sich das Wachstum der Bakterien eingestellt hatte. Am nächsten Morgen wurden die CFUs

der Agarplatten unter Berücksichtigung der jeweils ausplattierten Verdünnungsstufe ausgezählt. Zum einen wurde nun die gemessene OD₆₀₀ und die Zeitpunkte der Bakterientnahme gegeneinander auf einen Graphen aufgetragen. Dies gab Auskunft darüber, ab und bis zu welchem Zeitpunkt sich das Bakterienwachstum in der exponentiellen Phase befand. Nur in diesem Wachstumsabschnitt besteht eine lineare Korrelation von OD₆₀₀ und CFU/ml. Zum anderen wurde die OD₆₀₀ und die CFUs in einem weiteren Graphen gegeneinander aufgetragen. So konnte eine Formel ermittelt werden, aus der die benötigte Menge Bakterien anhand der OD₆₀₀ errechnet werden konnte.

5.3. Bakterien in den *in vitro* und *in vivo* Experimenten

Für die *in vitro* Versuche wurden Bakterien der Übernachtskultur verwendet und auf OD₆₀₀ = 2,4 eingestellt. Dies entspricht einer Menge von $1,4 \times 10^9$ CFU/ml.

Für die *in vivo* Versuche wurde die Übernachtskultur auf eine OD₆₀₀ von 1,6 eingestellt. Davon wurden 100 µl in einen mit 50 ml BHI gefüllten Erlenmeyerkolben überführt und wieder in den Schüttelinkubator gestellt. Sobald sich die Bakterienkultur in der exponentiellen Phase befand konnten die Bakterien geerntet und mit der aus der Wachstumskurve ermittelten Formel die benötigte Menge von 2×10^7 CFU in 100 µl Injektionsvolumen pro Tier errechnet werden.

Die benötigte Menge der Bakteriensuspension wurde in ein Eppendorf-Gefäß überführt und mit einer Tischzentrifuge (Centrifuge 5810R, Eppendorf, Hamburg) drei Minuten bei 9291 g zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und das Bakterienpellet mit einer Phosphat-gepufferten Salzlösung (Phosphate-buffered saline, PBS) resuspendiert. Der erste Zentrifugationsschritt wurde wiederholt und anschließend wurde das Bakterienpellet mit der gewünschten Menge an PBS resuspendiert, um ein Endvolumen von 100 µl mit einer Endkonzentration von 2×10^7 CFU pro Tier zu erhalten. Um weiterem Wachstum vorzubeugen, wurden die Bakterien bis zur Injektion bei 4°C gelagert.

6. Fluoreszenzmikroskopie

6.1. Prinzip

Sir Georg Stokes entdeckte die Fluoreszenz als er Chinin untersuchte. Werden konkrete Moleküle, die sogenannten Fluorochrome oder Fluorophore mit Licht

einer definierten Wellenlänge angestrahlt, entsenden diese Licht. Das entsendete Licht hat dabei eine größere Wellenlänge als das anstrahlende Licht. Diese Wellenlängenverschiebung wird daher als Stoke's Shift bezeichnet. 1935 beschrieb Alexander Jablonski die grundlegenden physikalischen Prinzipien der Fluoreszenz.

Die Elektronen der Fluorochrome werden durch Licht geeigneter Wellenlängen aus dem Grundzustand in einen angeregten Zustand gehoben. Durch Vibration verlieren sie einen Teil der Energie, die für die Anregung notwendig ist. Danach kehren sie wieder zum Grundzustand zurück und senden nun die freiwerdende Energie als längerwelliges Licht aus (Emission).

Für die Aufnahme der histologischen Präparate wurde ein Auflicht-Fluoreszenzmikroskop (Axio Imager.M2, Carl Zeiss, Jena) verwendet, ein sogenanntes Epifluoreszenzmikroskop. Dessen Kollimatorlinsen erzeugen eine Bündelung des Anregungslichts und lenken dieses auf den Anregungsfilter. Dieser engt das Licht in seinem Spektrum ein und lässt nur den Teil des Lichtes auf den Teilerspiegel durch, der für diese Wellenlängen undurchlässig ist. Das Anregungslicht wird vom Teilerspiegel zum Objektiv reflektiert und dieses fokussiert das Licht auf das Präparat. Die Fluorochrome im Präparat werden durch das Licht angeregt und strahlen Fluoreszenzlicht ab. Das Objektiv leitet das Licht wieder zum Teilerspiegel. Für das nun längerwelligere Licht ist der Teilerspiegel passierbar. Das ankommende Fluoreszenzsignal durchläuft im Weiteren den Emissionsfilter, der das Licht einengt und so ein spezifisches Signal ermöglicht, bevor es zum Okular beziehungsweise zur Kamera (AxioCam MRm, Carl Zeiss Jena) gelangt [170].

6.2. Konfokale Mikroskopie

Bei dickeren und stark streuenden Präparaten wird die Fluoreszenz im Präparat bei der Epifluoreszenzmikroskopie neben der Fokusebene auch in Bereichen ober- und unterhalb dieser Ebene angeregt. Dadurch wird das scharfe Bild von unscharfen Bildern überlagert, wirkt sich negativ auf die Bildqualität aus und führt dazu, dass vorhandene Strukturen im Präparat nicht mehr erkennbar sind. Musste man früher auf sehr dünne Präparatschnitte zurückgreifen, kann man heute durch die Verwendung eines konfokalen Mikroskops (CLSM) die störenden Hintergrundinformationen vermeiden. Das konfokale Mikroskop macht Bilder

deutlich höherer Qualität mit erhöhter optischer Auflösung und stärkerem Bildkontrast. Marvin Minsky entwickelte das Fokale Prinzip bereits in den 1950er Jahren an der Harvard Universität. Dies gründet sich auf den Einbau zweier Lochblenden (Pinhole) ins Mikroskop. Eine Lochblende wird in die Feldblendenebene des Mikroskops eingeführt. Sie ist konjugiert zur Fokusebene des Objektivs und bewirkt die ausschließliche Abbildung dieser Ebene, da Ebenen außerhalb dieser Fokusebene viel schwächer durch das Licht angeregt werden. Eine weitere Lochblende wird vor dem Detektor eingebaut. Somit werden Fluoreszenzsignale, die nicht in der Fokusebene liegen abgeschirmt, da sie nicht auf den Detektor gelangen. Eine weitere Stärke des konfokalen Mikroskops ist die erhöhte z-Auflösung. Dadurch gelingt es, auch dickere Präparate in optische Schnitte zu zerteilen. Diese Schnitte können sowohl einzeln analysiert als auch mit einer Software zu einem 3D-Konstrukt zusammengefügt und räumlich abgebildet werden [170]. Es können bis zu vier Fluorochrome verschiedener Wellenlängen durch die eingebauten Emissionsfilter detektiert werden.

6.2.1. Das Airyscan-Prinzip

Im klassischen konfokalen Mikroskop bestimmt die Größe des Pinholes die Auflösung. Das gesamte Emissionslicht außerhalb der Fokusebene wird am Pinhole zurückgewiesen. Je kleiner die Öffnung des Pinholes ist, desto höher wird die Bildauflösung, jedoch sinkt damit gleichzeitig die Lichtintensität, da weniger Photonen den Detektor erreichen. Um dieses Dilemma zwischen Auflösung und Licht-Effizienz zu lösen, wurde der Lochblende eine lichtempfindliche, mit kleinen Pinholes versehene Detektorfläche nachgeschaltet. Das klassische konfokale Pinhole im Strahlengang bleibt geöffnet und nun trifft das gesamte Licht auf den Airy-Disk-Flächendetektor. Eine Software verrechnet alle Einzelsignale anschließend zu einem hochaufgelösten Bild mit optimiertem Signal-Rausch-Abstand [171].

7. *In-Vitro*- Experimente

7.1. Isolation muriner Thrombozyten

Zur Isolation der Thrombozyten aus dem Vollblut wurde im Vorfeld ein HEPES-Tyrode's-Puffer hergestellt. Dieser diente als physiologisches Medium für die empfindlichen Thrombozyten und beugte vorzeitiger Aktivierung vor. Hergestellt wurde der Puffer aus 9 ml steril filtriertem Tyrode's (12,1 mM NaHCO₃ (VWR

International, Darmstadt), 136,9 mM NaCl (VWR, International, Darmstadt) 2,6 mM KCl (VWR International, Darmstadt), 10 mM HEPES (HEPES, Invitrogen, Darmstadt) und 5,5 mM D (+)-Glucose (Merck KGaA, Darmstadt. Der Puffer wurde mit 2 normaler Salzsäure (2N = 2M) mittels eines pH-Messgeräts (pH 7110, Xylem Analytics, Weilheim) auf einen pH-Wert von 6,5 eingestellt.

Nach der intrakardialen Blutabnahme wurde 1 ml Mäuseblut mit einem 1 ml Tyrode's Puffer (pH 6,5) in einem FACS Röhrchen vorsichtig vermischt und bei 70 g, ohne Bremse und mittlerer Beschleunigung 20 Minuten bei Raumtemperatur zentrifugiert. Das überstehende thrombozytenreiche Plasma (PRP, „platelet rich plasma“) wurde abgenommen, in ein neues FACS Röhrchen überführt und anschließend mit 3 ml Tyrodes's Puffer (pH6,5) und 100 ng/ml Prostaglandin (PGL₂, Prostaglandin I2 sodium salt, Abcam) behutsam vermengt. Das vorsichtige Pipettieren der Thrombozyten ist hierbei besonders wichtig, um eine vorzeitige Aktivierung zu vermeiden. Durch 5-minütiges Zentrifugieren bei 1200 g und höchster Beschleunigung und Bremse setzten sich die Thrombozyten als Pellet am Boden des FACS Röhrchens ab. Der Überstand wurde abgenommen und die Thrombozyten mit Tyrode's Puffer (pH 6,5) verdünnt.

7.1. μ-Kammer-Assay

In unserer Arbeitsgruppe wurde bereits ein 2D-Assay entwickelt, bei dem Thrombozyten auf Fibrinogen-beschichteten Deckgläsern wandern und Bakterien bündeln und binden können (siehe II.2.1.2). Um zu untersuchen, ob Thrombozyten auch in einem Gerinnsel ihre mechanischen Kräfte nutzen, um Bakterien zu bündeln, wurde in dieser Arbeit ein 3D-Assay etabliert.

7.1.1. Farbstoffe

Anfang des 20. Jahrhunderts wurden Fluorochrome als vitale Färbungen in der Mikroskopie eingeführt. Allerdings fanden sie erst in den 1920er Jahren umfassendere Anwendung, als Fluoreszenzmikroskopie erstmals zur Untersuchung von Farbstoffbindungen in fixierten Geweben und lebenden Zellen diente. Eine Technik, um Antikörper mit fluoreszierenden Farbstoffen zu markieren, wurde jedoch erst von Albert Coons in den 1940er Jahren entwickelt. Das Feld der Immunfluoreszenz war geboren. In den letzten 70 Jahren haben

Fortschritte in der Immunologie und Molekularbiologie ein weites Spektrum von Sekundärantikörpern hervorgebracht [172].

Um die Thrombozyten sichtbar zu machen, sie jedoch in ihrer Funktion nicht zu beeinträchtigen, wurde für die vorliegende Arbeit ein fluoreszenzmarkierter Antikörper (DyLight 488 mouse platelet labeling, Emfret ANALYTICS, Eibelstadt) gewählt. Der Antikörper bindet an die GPIIb-Einheit des Thrombozyten/Megakaryozyten spezifischen GPIIb-V-IX Komplexes der Maus. Der Antikörper ist weder zytotoxisch, noch wirkt er sich auf die Aggregations- und Adhäsionsfähigkeit der Thrombozyten aus [173-175]. Der Antikörper wurde an isolierten Thrombozyten in der Verdünnung 1:100 eingesetzt.

Für die Färbung von *S. aureus* wurde ein roter Fluoreszenzfarbstoff gewählt (eBioscience Cell Proliferation Dye eFluor 670, Thermo Fischer Scientific). Der Fluoreszenzfarbstoff bindet an jegliche zellulären Proteine, die primäre Amine enthalten. Seine Spitzenanregung liegt bei 647 nm und wird durch den roten Laserstrahl (633 nm) angeregt. Der Fluoreszenzfarbstoff wurde mit dem organischen Lösungsmittel DMSO zu einer Konzentration von 5 mM rekonstituiert und aliquotiert. Er wurde vor Licht geschützt bei -20°C gelagert und mit einer Endkonzentration von 5 µM verwendet. Dafür wurde die gewünschte Menge an Bakterien pro Milliliter der Übernachtskultur in ein Eppendorf-Gefäß gegeben und bei 9391 g drei Minuten in einer Tischzentrifuge zentrifugiert. Das so gewonnene Pellet wurde nun mit 1 ml PBS resuspendiert und 1 µl des *S. aureus*-markierenden Farbstoffs hinzugegeben. Nach einer Inkubationsdauer von 30 Minuten folgten zwei weitere Zentrifugationsschritte, wobei das Pellet jeweils mit 1 ml PBS resuspendiert wurde.

Als Fibrinogen-markierender Farbstoff wurde fluoreszenz-markiertes Fibrinogen verwendet (Fibrinogen from human plasma, Alexa Fluor 594 Conjugate, Invitrogen, 1,5 mg/ml), das in einem Verhältnis von 1 : 10 zum farblosen Fibrinogen eingesetzt wurde.

Um zwischen lebenden und toten Bakterien unterscheiden zu können, wurden die Bakterien mit einer Doppelfärbung von rot-fluoreszierendem Propidium Iodid (PI) und grün-fluoreszierenden Syto9 gefärbt (LIVE/DEAD BacLight Bacterial Viability Kit, Thermo Fisher). Diese Färbung differenziert zwischen toten und lebenden Zellen, indem davon ausgegangen wird, dass eine lebende Zelle eine

intakte Zellmembran besitzt [176]. Die Spitzenanregung/ Emission von Syto9 liegt bei 480/500 nm und von PI bei 490/635 nm. Während Syto9 die intakten Bakterienzellmembranen passieren kann, kann PI nur in zerstörte Zellmembranen von toten Bakterien eindringen [177, 178].

7.1.2. Durchführung des μ -Kammer-Assays

Für den μ -Kammer-Assay wurden die Thrombozyten und der *S. aureus* fluoreszierend markiert sowie fluoreszierendes Fibrinogen verwendet, um die Strukturen des Gerinnsels später unter einem Mikroskop darstellen zu können (siehe 7.1.1.).

Fibrinogen, Thrombozyten, deren Aktivatoren, *S. aureus*, Kalzium und Thrombin wurden dafür in einem Eppendorf-Gefäß vermischt und davon je 30 μ l in eine μ -Kammer (μ -Slide VI^{0.1} ibi Treat, ibidi GmbH, Martinsried) pipettiert. Es wurden zwei Gruppen unterschieden: Gerinnsel mit Wildtyp-Thrombozyten und Gerinnsel mit para-Nitroblebbistatin (para-Nitroblebbistatin, Optopharma, Budapest) inhibierten Thrombozyten (Konzentrationen siehe Tabelle 1). Das para-Nitroblebbistatin hemmt die Thrombozyten in ihren kontraktile Kräfte [71]. Es wirkt ähnlich inhibitorisch auf Myosin II wie Blebbistatin, hat aber den Vorteil gegenüber seines Derivats, dass es photostabil ist, weder zytotoxisch wirkt, noch fluoresziert [179].

Tabelle 1: Komponenten und Konzentrationen im μ -Kammer-Assay

Substrat (Konzentration)	Gerinnsel mit Wildtyp- Thrombozyten	Gerinnsel mit Blebbistatin- gehemmten Thrombozyten
Fibrinogen	0,9 mg/ml	0,9 mg/ml
Fibrinogen AF 594	0,1 mg/ml	0,1 mg/ml
Thrombozyten	1×10^6 U/ml	1×10^6 U/ml
MRSA	$1,4 \times 10^9$ CFU/ml	$1,4 \times 10^9$ CFU/ml
para- Nitroblebbistatin	-	50 μ M
ADP	4 μ M	4 μ M
U46619	2 μ M	2 μ M
Kalzium	500 μ M	500 μ M
Thrombin	0,5 U/ml	0,5 U/ml

Die Gerinnsel wurden bei 37°C für eine Stunde inkubiert und danach mit 4%igem PFA (16 % Formaldehyde Solution, Methanol-free, Thermo Fisher Scientific, Rockford, USA, 1 : 4 verdünnt) fixiert.

7.1.3. μ -Kammer-Assay nach Fluss

Zur Beantwortung der Frage, ob und mit welcher Effektivität sowohl intakte als auch mechanisch gehemmte Thrombozyten fähig sind, Bakterien auch unter Fluss-Bedingungen festzuhalten, wurde der μ -Kammer-Assay mithilfe eines Pumpsystems gespült.

Für den Fluss-Assay wurden wie unter IV.7.1.2 aufgeführt wiederum zwei Gruppen (Wildtyp- und para-Nitroblebbistatin-gehemmte Thrombozyten) an Gerinnsel in der μ -Kammer gebildet und eine Stunde bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurden diese Gerinnsel an ein Pumpsystem (KDS-100-CE, KD Scientific Inc., Holliston, USA) angeschlossen. Mit Tyrode's Puffer (pH 7,2) als Medium wurde das Gerinnsel einem Fluss von 2 ml/h für 2 Minuten ausgesetzt. Dafür wurde der Tyrode's Puffer in eine 20 ml Spritze überführt und diese an einen zuführenden Schlauch angeschlossen, der am anderen Ende an die μ -Kammer angebracht wurde. Zum Abführen der Flüssigkeit diente ein weiterer Schlauch, der an der gegenüberliegenden Öffnung der μ -Kammer befestigt wurde. Zur Gewährleistung der physiologischen Temperatur von 37 °C, wurde der Tyrode's Puffer zuerst im Wasserbad erwärmt und von da an mit einer Wärmematte warmgehalten.

7.1.4. Lebend/tot-Assay

Um zu untersuchen, inwiefern das Bündeln von Bakterien durch Thrombozyten Einfluss auf das bakterielle Überleben hat und ob die Thrombozyten generell in einem Gerinnsel in der Lage sind, Bakterien abzutöten wurden die Gerinnsel in der μ -Kammer mit einer lebend/tot Doppelfärbung behandelt (siehe 7.1.1).

Drei Gruppen an Gerinnsel wurden in ein Eppendorf-Gefäß überführt. Eine Gruppe mit Wildtyp-Thrombozyten, eine Gruppe mit para-Nitroblebbistatin-inhibierten Thrombozyten und eine Gruppe ohne Thrombozyten. Weder die Bakterien noch die Thrombozyten wurden in diesem Assay angefärbt, noch wurde farbiges Fibrinogen verwendet. Zur lebend/tot Färbung wurden jeweils 0,2 μ l Syto9 und PI zu den Gerinnseln dazugegeben. Davon wurden 30 μ l in die μ -Kammer überführt und eine Stunde bei 37°C inkubiert. Danach wurden die Gerinnsel zum Entfernen der Farbstoffe gespült und mit 4%igem PFA fixiert.

7.1.5. Aufnahme und Auswertung der Gerinnsel

Die Gerinnsel wurden mit einem konfokalen Mikroskop (LSM 800 mit Airyscan, Carls Zeiss Microscopy, Jena) abfotografiert. Dazu wurden mit einem 40x-Objektiv pro Gerinnsel fünf Bilder entlang der μ -Kammer aufgenommen, die aus 30 Schnittebenen mit einem Abstand von je 0,8 μm bestanden. Der Bildausschnitt betrug 212,55 μm x 212,55 μm mit einer Tiefe von 24 μm , die Pixelzahl 1024 x 1024.

Die abfotografierten Bilder wurden anhand der Imaris 8.4 Software (Bitplane AG, Zürich, Schweiz) ausgewertet. Dazu wurden sowohl für die Bakterien als auch für die Thrombozyten, Volumina mit der „Surface“-Funktion erstellt und 3D-Rekonstruktionen angefertigt, mit deren Hilfe die Größe der Aggregate ermittelt werden konnten.

Mit der Funktion „Distance Transformation“ wurden die Abstände zwischen den Thrombozyten- und Bakterienvolumina berechnet und etwaige Kolokalisationen bestimmt. So konnten auch die Größe der Aggregate in Kolokalisation ermittelt werden.

Für die Auswertung des Fluss-Assays wurden die statischen Gerinnsel mit gespülten Gerinnseln verglichen und quantifiziert.

Die Auswertung der lebend/tot Färbung geschah ebenfalls mit der Imaris 8.4 Software und der Erstellung von Volumina. Als Positiv-Kontrolle für tote Bakterien diente ein Gerinnsel, bei dem die Bakterien durch 70%igen Ethanol abgetötet wurden. Die Positiv-Kontrolle für die lebenden Bakterien stellte das Gerinnsel ohne Thrombozyten dar.

Für die Auswertung wurde jeweils der Mittelwert der fünf aufgenommenen Bilder pro μ -Kammer herangezogen.

7.2. Transmigrationsassay

7.2.1. Transmigrationsassay mit Thrombozyten

Um zu erforschen, ob Thrombozyten in der Lage sind, auch im Gerinnsel Bakterien an sich zu binden, festzuhalten und damit die bakterielle Dissemination im Organismus zu reduzieren, wurde ein Transmigrations-Assay etabliert (siehe Abbildung 11). Das Prinzip begründet sich auf der Wanderung von Bakterien vom

nährstoffarmen ins nährstoffreiche Medium und wurde von Macrae *et al.* beschrieben [180].

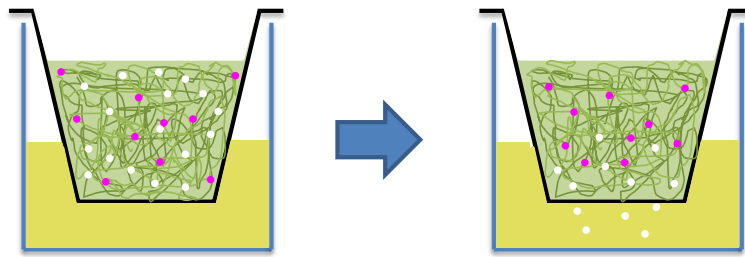


Abbildung 11: Darstellung des Transmigrationsassays

Die Transmigrationskammer wurde mit einem Gerinnsel aus Fibrinogen, *S. aureus* und Thrombozyten gefüllt. Über einen Zeitraum von 5 h wanderten die Bakterien vom Gerinnsel in das nährstoffreiche Medium. Das Medium wurde auf Agarplatten ausgestrichen und am nächsten Tag die CFUs gezählt.

Thrombozyten = Magenta, *S. aureus* = Weiß, Fibrin(ogen) = Grün, S.O.C. Medium = Gelb

Dafür wurden nach der intrakardialen Blutabnahme die Thrombozyten isoliert, mit einem Blutanalysegerät (ABX Micros ES60, Horiba Medical) gezählt und mit Tyrode's Puffer (pH 6,5) auf 1000 Thrombozyten/ μ l verdünnt.

Danach wurden Fibrinogen (Human Fibrinogen, Sigma-Aldrich), Bakterien, Thrombozyten, sowie die Thrombozytenaktivatoren ADP (ADP sodium salt, sigma) und TXA₂ (U46619, Enzo Life Science) Kalzium und Thrombin (Thrombin from bovine plasma, Sigma-Aldrich) in einem 1,5 ml Eppendorf-Gefäß gemischt (Konzentration siehe Tabelle 2) und zügig in eine Migrationskammer (Cell Culture Insert, Transparent PET Membrane, 24 Well, 1.0 μ m pore size, Corning) mit einer Porendicke von 1 μ m pipettiert. Die Porendicke von 1 μ m ist groß genug, damit die durchschnittlich 1 μ m großen Staphylokokken durchwandern können, jedoch auch klein genug, um ein Durchfallen der Bakterien zu verhindern.

Tabelle 2: Komponenten und Konzentrationen im Transmigrationsassay

Substrat (Konzentration)	Gerinnsel mit Wildtyp- Thrombozyten	Gerinnsel mit Blebbistatin- gehemmten Thrombozyten	Gerinnsel ohne Thrombozyten
Fibrinogen	1 mg/ml	1 mg/ml	1mg/ml
Thrombozyten	1 x 10 ⁶ U/ ml	1 x 10 ⁶ U/ ml	-
MRSA	1,4 x 10 ⁹ CFU/ml	1,4 x 10 ⁹ CFU/ml	1,4 x 10 ⁹ CFU/ml
para- Nitroblebbistatin	-	50µM	-
ADP	4 µM	4 µM	4 µM
U46619	2 µM	2 µM	2 µM
Kalzium	500 µM	500 µM	500 µM
Thrombin	0,5 U/ml	0,5 U/ml	0,5 U/ml

Die Transmigrationskammer wurde anschließend in eine Well-Platte (Costar 24 Well Plate, ultra-low attachment surface, Corning) gesetzt, die mit 600 µl S.O.C. Medium (S.O.C. Medium, Invitrogen) gefüllt war. Es wurden vier Gruppen geformt:

1. Ein Gerinnsel ohne Thrombozyten, als Kontrollgruppe um den mechanischen Einfluss von MYH9-gehemmten oder ungehemmten Thrombozyten zu kontrollieren.
2. Ein Gerinnsel mit Thrombozyten einer Wildtyp-Maus der Linie C57BL/6J
3. Ein Gerinnsel mit Thrombozyten der Linie C57BL/6J, die durch para-Nitroblebbistatin in ihren kontraktilen Kräften gehemmt wurden.
4. Ein Gerinnsel mit isolierten Thrombozyten einer Pf4-Cre x MyH9^{fl/fl} Knockout-Maus, die mechanisch gehemmte Thrombozyten aufweist (siehe IV.1.2).

Beim Gerinnsel ohne Thrombozyten wurde die entsprechende Menge mit Tyrode's Puffer (pH6,5) substituiert, da die Thrombozyten in diesem verdünnt waren. Das para-Nitroblebbistatin war in DMSO gelöst, somit wurden bei Gerinnsel ohne para-Nitroblebbistatin die entsprechende Menge mit DMSO substituiert.

Die Gerinnsel wurden 5 Stunden bei 37 °C in einem Inkubator inkubiert. Nach der Inkubation wurden jeweils 200 µl des S.O.C. Mediums auf einer BHI-Agar Platte ausplattiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Am nächsten Morgen wurden die CFUs gezählt.

7.2.2. Transmigrationsassay mit den Sekreten aktivierter Thrombozyten

Wie in II.3.1 erwähnt, besitzen Thrombozyten eine Anzahl antimikrobieller Proteine, die nach Aktivierung aus ihren Granula ausgeschüttet werden. Mithilfe dieser Sekrete sind sie in der Lage, Pathogene durch die Zerstörung der Zellmembran unschädlich zu machen. Um zu kontrollieren, ob diese Sekrete ebenfalls Einfluss auf die Bakterientransmigration haben, wurde ein Assay mit den Sekreten aktivierter Thrombozyten etabliert.

Hierfür wurden nach der intrakardialen Blutabnahme die Thrombozyten isoliert und auf 2000 Thrombozyten/ μ l mit Tyrode's (pH 6,5) verdünnt.

Die Thrombozyten wurden mit 4 μ M ADP und 2 μ M TXA₂ aktiviert und bei Raumtemperatur 15 Minuten inkubiert. Anschließend wurde mithilfe einer Tischzentrifuge bei 9391 g 3 Minuten zentrifugiert und der Überstand, der nun die Sekrete der Thrombozyten enthielt, abgenommen (siehe Abbildung 12). Die Thrombozyten wurden verworfen.

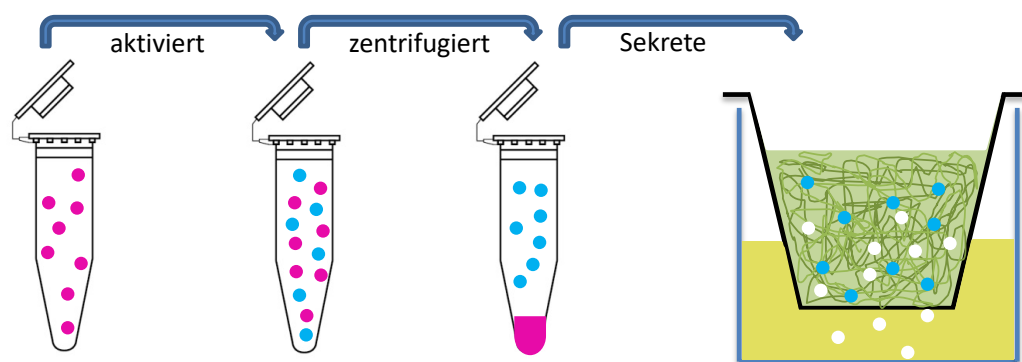


Abbildung 12: Darstellung des Überstand-Assays

Um den Effekt der bakteriziden Sekrete der Thrombozyten im Gerinnsel zu erforschen, wurde ein Überstands-Assay etabliert. Dazu wurden die Thrombozyten zuerst mit ADP und TXA₂ aktiviert, die Thrombozyten anschließend zentrifugiert und nur der Überstand mit den Sekreten für den Transmigrations-Assay verwendet.

Thrombozyten = Magenta, Sekrete = Blau, *S. aureus* = Weiß, Fibrin(ogen) = Grün, S.O.C. Medium = Gelb

In der Transmigrationskammer wurde nun wiederum ein Gerinnsel aus Fibrinogen, Bakterien, Thrombozytensekreten, Kalzium und Thrombin hergestellt (Konzentrationen siehe Tabelle 3).

Tabelle 3: Komponenten und Konzentrationen im Überstands-Assay

Substrat (Konzentration)	Gerinnsel ohne Sekrete/Faktor XIII	Gerinnsel mit Sekreten	Gerinnsel mit Faktor XIII
Fibrinogen	1 mg/ml	1 mg/ml	1 mg/ml
Überstand	-	Sekrete von 2x10 ⁶ Thrombozyten /ml	-
MRSA	1 x 10 ⁹ CFU/ml	1 x 10 ⁹ CFU/ml	1 x 10 ⁹ CFU/ml
Faktor XIII	-	-	10 µg//ml
Kalzium	500 µM	500 µM	500 µM
Thrombin	0,5 U/ml	0,5 U/ml	0,5 U/ml

Es wurden drei Gruppen unterschieden:

1. Ein Gerinnsel ohne Sekrete/Faktor XIII
2. Ein Gerinnsel mit den Sekreten der Thrombozyten
3. Ein Gerinnsel mit Faktor XIII (Native Human Factor XIII protein, Abcam), um den Effekt der Fibrinstruktur zu überprüfen. Durch Quervernetzung der Fibrinfasern stabilisiert er das Fibrinnetzwerk des Gerinnsels. Es wurde bereits *in vitro* gezeigt, dass Faktor XIII in Anwesenheit von Blutplasma Bakterien an Fibrinfasern vernetzen und vermehrt binden kann [181].

Bei den Gruppen ohne Sekrete wurde mit Tyrode's (pH 6,5) substituiert, bei den Gruppen ohne Faktor XIII mit DMSO. In die Well-Platten wurde auch hier 600 µl S.O.C. Medium pipettiert und die Transmigrationskammer hineingesetzt. Die Gerinnsel wurden bei 37°C für 5 Stunden inkubiert. Danach wurden je 200 µl des jeweiligen S.O.C Mediums auf einer BHI-Agar Platte ausgestrichen und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Am nächsten Morgen wurden die CFUs ausgezählt.

8. Endokarditis Modell

Um der Pathogenese der infektiösen Endokarditis auf den Grund zu gehen und den dringenden Bedarf an verbesserter Diagnostik und Behandlungsmöglichkeiten anzugehen, wurden diverse experimentelle Modelle der *S. aureus* Endokarditis etabliert [182]. Bereits im 20. Jahrhundert wurden zum ersten Mal Tiermodelle zur Untersuchung der *S. aureus* Endokarditis herangezogen. Damals wurden die Versuche vor allem an Großtieren durchgeführt, was jedoch einen umfangreichen chirurgischen Eingriff forderte, um ein Trauma an der Herzklappe zu setzen. Zudem war die nachfolgende bakterielle Kolonisation sehr unzuverlässig [183]. In

den 1970er Jahren wurden von Garrison und Freedman [184] zum ersten Mal Modelle an Ratten und Kaninchen beschrieben, die einen Katheter zum Verletzen der Herzklappe nutzten [185, 186]. Bei diesen Tierarten konnten die bakteriellen Vegetationen problemlos makroskopisch an den Herzklappen erkannt und für weitere Untersuchungen entfernt werden. Die Körpergröße dieser Tiere forderte jedoch eine hohe Menge an Arzneimitteln, was oft zu experimentellen Einschränkungen führte. Heutzutage wird das Model der infektiösen *S. aureus* Endokarditis auch an Mäusen durchgeführt, das Gibson et al 2007 [187] etabliert hat. Durch das Einführen eines Polyethylen-Katheters durch die rechte *A. carotis communis* bis zur Aortenklappe, wird ein Trauma an der Aortenklappe induziert. Es konnte gezeigt werden, dass die Verletzung der Aortenklappe durch den Katheter zur Ablagerung von Fibrin, zu Nekrose und aktivierten Makrophagen und Fibroblasten in der Adventitia führt. Anschließend wird die Maus intravenös mit Bakterien infiziert, was die Formation von Vegetationen am geschädigten Endothel der Aortenklappe zur Folge hat. Diese Aggregate bestehen aus einer Matrix aus Fibrin, Thrombozyten und Bakterien, die ca. drei- bis viermal größer sind, als Vegetationen von Tieren, die zwar infiziert wurden, denen jedoch kein Schaden an der Aortenklappe gesetzt wurde [187, 188].

8.1. Operationstechnik

Für diesen Versuch (siehe Abbildung 13) wurden sowohl männliche als auch weibliche Mäuse der Linien C57BL/6J und Pf4-Cre x MyH9^{fl/fl} verwendet.

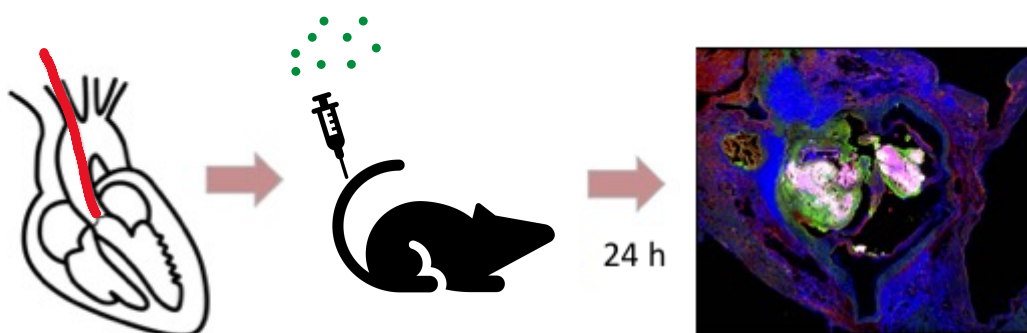


Abbildung 13: Schematische Darstellung des Endokarditis-Modells

Über die *A. carotis communis* wurde unter Ultraschallkontrolle ein Faden bis zur Aortenklappe vorgeschoben, der einen Endothelschaden an der Aortenklappe setzte. Anschließend wurde die Maus über die Schwanzvene mit 2×10^7 CFU des *S. aureus* infiziert. Für 24 Stunden wurde das Tier engmaschig überwacht (siehe Abbildung 14). Daraufhin wurde das Herz entnommen und histologische Schnitte angefertigt.

Die Mäuse wurden wie in Kapitel III.3 beschrieben anästhesiert. Der rechte ventrale Hals- und Brustbereich wurde mit einer Enthaarungscreme (asid-med, AsidBonzGmbH, Herrenberg) sorgfältig enthaart. Dies ist sowohl für den chirurgischen Eingriff als auch für das Ultraschallbild unerlässlich. Die Operation erfolgte unter einem Operationsmikroskop (Stemi 2000-C, Carl Zeiss, Jena). Dafür wurde die Maus auf den Rücken gelegt und unter dem Mikroskop an den Gliedmaßen fixiert. Um die Thermoregulation der Maus zu gewährleisten, wurde eine Wärmeplatte verwendet. Durch Zuhilfenahme einer 1 ml Spritze, die dorsal unter den Nacken geschoben wurde, wurde der Hals der Maus überstreckt, was das Präparieren erleichterte.

Zu Beginn wurde in der Medianen vom Hals eine ca. 1 cm lange Inzision gesetzt. Das Gewebe wurde mittels mikrochirurgischen Bestecks stumpf präpariert, bis die Speicheldrüse freigelegt war. Deren rechter Teil wurde sanft angehoben, nach außen geklappt und mit einem feuchten Tuch bedeckt, um einer Austrocknung vorzubeugen. Nun wurde wiederum stumpf die rechte Halsschlagader präpariert, die dabei vorsichtig vom Vagusnerv getrennt werden musste und mit einem 6-0 Faden (Prolene, monofil, nicht resorbierbar, Ethicon, Johnson & Johnson Medical GmbH, Norderstedt) kranial ligiert. Daraufhin wurde mit einer 27-G-Nadel ein kleines Loch in die *A. carotis communis* gestochen, durch das ein Faden der Stärke 2-0 (Ethibond Excel, Polyester beschichtet, nicht resorbierbar, Ethicon, Johnson & Johnson Medical GmbH, Norderstedt) eingeführt und durch Zuhilfenahme einer Mikropinzette bis zur Aortenklappe vorsichtig unter sonografischer Sichtkontrolle vorgeschoben wurde. Der Faden wurde an der Karotis mit einem 6-0 Faden fixiert und so platziert, dass die Aortenklappe konstant gegen den Faden schlug, um auf diese Weise einen Endothelschaden der Herzklappe zu erreichen. Nach 30 Minuten wurde der Faden wieder aus der Karotis entfernt und die Arterie ligiert. Der Hautschnitt wurde mit Einzelheften und einem 8-0 Faden (Prolene, monofil, nicht resorbierbar, Ethicon, Johnson & Johnson Medical GmbH, Norderstedt) zugenäht und anschließend mit einer Jodlösung benetzt. 20 Minuten vor dem Aufwachen wurde der Maus Buprenorphin subkutan verabreicht. Nach dem Aufwachen wurden die Mäuse einzeln gesetzt und die Käfige auf Wärmematten gestellt, wobei die Tiere stets Zugang zu Wasser und Futter hatten.

Zirka sechs Stunden nach der Operation wurden den Mäusen intravenös über die Schwanzvene (siehe IV.8.4) 2×10^7 CFU des *S. aureus* injiziert (siehe Kapitel III.9). Die Tiere waren ab diesem Zeitpunkt in einem Tierhaltungsschrank (Ventilated Cabinet, Tecniplast Deutschland GmbH, Hohenpreißenberg) untergebracht und engmaschig überwacht. In regelmäßigen, festgelegten Abständen wurden Allgemeinbefinden, Nahrungsaufnahme, Bewegungsaktivität, Verhalten sowie Harn- und Kotabsatz mittels Score-Sheets (siehe Abbildung 14) beurteilt und notiert. Anhand der aufgeführten Parameter, die durch ein Punktesystem (Score 0-2) bewertet wurden, waren die Abbruchkriterien für den Versuch streng definiert. Bei mehrmaliger Bewertung von Score-1 oder einmaliger Vergabe von Score-2 musste der Versuch unverzüglich abgebrochen und die Maus euthanasiert werden.

Score Sheet Endocarditis Modell (I)

Chronische Versuche

Scorezeitpunkt (SZP)

Uhrzeit

Operation: Endikarditis-Modell, Injektion *S. aureus* Operation (ca. 45 min)

				Tag 1 (post OP)			Tag 2	
				SZP0	post OP	SZP1	SZP2	SZP3
						09:00	13:00	17:00
							09:00	13:00
Parameter	Score 0	Score 1	Score 2					
Allgem. Befinden	gut (normale Aktivitäten, z.B. Fressen, Ruhen, Bewegen)	vermindert (gewölbter Rücken, gesträubtes Fell, bewegt sich verlangsamt) angestrenzte Atmung, eingefallene Flanken	stark vermindert Dehydriert, apathisch, kühle Körperoberfläche, flache oder Pumpatmung, Schwellungen, kachektisch, verklebte Augen	kontrolliertes Erwärmen auf der Wärmematte				
Nahrungsaufnahme	Tiere fressen, (Körpergewicht erhalten)	verminderte Nahrungsaufnahme < 24h (Körpergewicht vermindert)	verminderte Nahrungsaufnahme > 24h (Körpergewicht vermindert)					
Bewegungsaktivität	umherlaufen, klettern an den Gitterstäben	zurückgezogen (hockt in der Ecke), schläfrig	liegt bewegungslos > 24h					
Verhalten	Nestbau, interessiert an der Umgebung, munter	Desinteresse an der Umgebung	Automutilation oder Apathisch, abgesondert					
Kotabsatz	normal	Durchfall < 24h	Blutung oder Durchfall aus dem Rektum > 24h oder fehlender Kotabsatz, Rektumprolaps					
Harnabsatz	normal	ggr. blutiger Harn	fehlender Harnabsatz					
Gesamtscore								

Abbruchkriterien: bei Score 2 oder mindestens drei Mal hintereinander Score 1

Abbildung 14: Score Sheet

Anhand dieses Score Sheets wurde die regelmäßige und engmaschige Überwachung der Tiere sichergestellt. Dabei wurden die jeweiligen Parameter als Score bewertet und der Gesamtscore ermittelt. Bei einmaligem Auftreten von Score 2 bzw. dreimaligen Auftreten von Score 1, musste der Versuch abgebrochen werden.

Die Maus wurde 24 Stunden nach der Bakterieninjektion erneut anästhesiert und mittels zervikaler Dislokation euthanasiert. Anschließend wurden Thorax und Abdomen eröffnet. Damit das Blut beim Spülen ablaufen konnte, wurde die Leber inzidiert. Mit einer 20-G-Nadel wurde der linke Ventrikel punktiert und die Organe vorsichtig mit 10 ml PBS gespült, um das Blut aus den Blutgefäßen auszuspülen und Artefakte in der darauffolgenden immunhistochemischen Färbung zu vermeiden. Daraufhin wurde das Herz sorgfältig mit einem Mikrobesteck herauspräpariert und die Herzspitze abgeschnitten, um die Fixierung zu beschleunigen. Das Herz wurde anschließend eine Stunde in 4%igem PFA fixiert und zur Vermeidung von Eiskristallen über Nacht in 30%iger Sucrose (Sucrose, Sigma-Aldrich) entwässert.

Die fixierten Herzen wurden am nächsten Morgen zum Präparieren in eine Petrischale, in die eine 40%ige Sucroselösung gefüllt war, gelegt. Unter einem Operationsmikroskop wurde nun mit Feinbesteck Herzkranzfett, Aortenbogen und übrige Gefäße an der Herzbasis entfernt, sodass nur noch der Stumpf der Aorta von der Herzbasis abstand. Danach wurde parallel zur Aortenklappe ein Schnitt gesetzt und die Herzspitze abgetrennt. Die Herzbasis mit der Aortenklappe wurde dann in eine Kryoeinbettform (Tissue-Tek Cryomold 25 x 20 x 5 mm, Sakura Finetek) gestellt und mit Einbettmedium (Tissue-Tek O.C.T Compound, Sakura Finetek Europe B.V., Alphenaan den Rijn, Niederlande) bedeckt. Bis zur Anfertigung der histologischen Schnitte wurden sie bei -80°C aufbewahrt.

Das Versuchsvorhaben wurde von der Regierung Oberbayerns gemäß § 7 des Deutschen Tierschutzgesetzes (Tierschutzgesetz in der Fassung der Bekanntmachung vom 18. Mai 2006 (BGBl. I S. 1206, 1313), das zuletzt durch Artikel 101 des Gesetzes vom 20. November 2019 (BGBl. I S. 1626) geändert worden ist) genehmigt. (Aktenzeichen ROB-55.2-2532.Vet_02-15-190).

8.2. Echokardiografiekontrolle

Bei bisher publizierten Endokarditis-Modellen an der Maus, wurde der Katheter zum Verletzen des Klappenendothels blind durch die *A. carotis communis* an die Aortenklappe vorgeschoben. Der Katheter wurde zum einen abgemessen und bis zu einer standardisierten Markierung eingeführt [187]. Zum anderen ging man von einem korrekten Sitz des Katheters aus, sobald die schnellen, vibrierenden Bewegungen der Aortenklappe bzw. das Pulsieren des linken Ventrikels auch am

Katheter sichtbar waren [188, 189]. Um die Lage des Katheters zuverlässig und visuell überprüfen und damit einen Endothelschaden der Aortenklappe garantieren zu können, wurde in dieser Arbeit eine Echokardiografiekontrolle des Endokarditis-Modells an der Maus etabliert.

8.2.1. Prinzip Sonografie

Die Sonografie (Ultraschall, Echographie) ist ein bildgebendes Verfahren, das auf der teilweisen Brechung piezoelektrisch erzeugter Schallwellen an Grenzschichten basiert. Je nach Zusammensetzung dieser Grenzflächen, kommt es entweder zu einer totalen Reflexion bei Wasser-Luft-Grenzen, einer Streuung bei rauen Oberflächen und zu geringen Echos zwischen Körpergewebeschnitten. Wird die Intensität der aufgefundenen Echos und die Laufzeit des ausgesandten Signals berechnet, lassen sich durch diese Informationen die Gewebegrenzen in Abhängigkeit von der Eindringtiefe unter dem Schallkopf, der in raschem Wechsel als Sender und Empfänger dient, rekonstruieren und bildlich darstellen. Aufgrund der Unschädlichkeit seiner Schallwellen und der schmerzfreien, nichtinvasiven Untersuchung, ist die Sonografie ein sehr vielseitiges und beliebtes Verfahren der bildgebenden Diagnostik. Bereits in den 1940er Jahren wurde die Sonografie zum ersten Mal medizinisch angewendet. Damals gab es jedoch lediglich ein eindimensionales Tiefenprofil, das A-Verfahren, bei dem eine graphische Darstellung der Amplitude der Reflexion in Abhängigkeit der Eindringtiefe möglich war. Durch die Kombination mehrerer Sende- und Empfangskristalle und durch die Übersetzung der Amplituden in Graustufen, wurde die Sonografie zur zweidimensionalen Darstellung weiterentwickelt. Die abgebildeten Gewebeschnitte waren zu dieser Zeit noch statisch. Erst mit Hilfe des Realtime-Verfahrens im B-Mode konnten die Gewebeschnitte gleichzeitig während der Untersuchung auf einen Bildschirm übertragen und dargestellt werden [190].

Die Untersuchung des Herzens mittels Ultraschalls, die sogenannte Echokardiographie, kann entweder transthorakal oder transösophageal geschehen. Durch die parasternale Darstellung der Längsachse des Herzens, können die *Aorta ascendens*, die Aortenklappe, sowie die vier Herzkammern sehr gut transthorakal dargestellt werden [191].

8.2.2. Durchführung der Echokardiografie

Die Maus befand sich anästhesiert, auf dem Rücken liegend auf einer Wärmeplatte. Nachdem mit einer Kanüle das Loch in die *A. carotis communis* gestochen worden ist, wurde der Faden ein Stück in die *A. carotis communis* eingeführt. Die mit Ultraschallgel (Sonosid Ultraschall-Gel, Asid Bonz GmbH, Herrenberg) versehene Linearsonde (MS55OD-0213, Fujifilm VisualSonics Inc., Toronto, Kanada) des Ultraschallgeräts (Vevo 2100 Imaging System, Fujifilm VisualSonics Inc., Toronto, Kanada) wurde rechtsseitig, parasternal auf Höhe des Rippenbogens angelegt. Durch geringfügige Lage- und Winkelveränderungen der Ultraschallsonde konnten die *A. carotis communis*, die *Aorta ascendens*, die Aortenklappe und die vier Herzkammern sehr gut dargestellt werden (siehe Abbildung 15). Unter Ultraschallkontrolle wurde nun der Faden durch die *A. carotis communis* in die *Aorta ascendens* und bis zur Aortenklappe vorgeschoben. Nach 30 Minuten wurde die korrekte Lage des Fadens echokardiografisch überprüft. Damit wurde sichergestellt, dass die Aortenklappe auch über die gesamten 30 Minuten an den Faden schlug und der Endothelschaden so standardisiert wie möglich gesetzt wurde. Die Echokardiografie wurde im B-Mode aufgenommen.

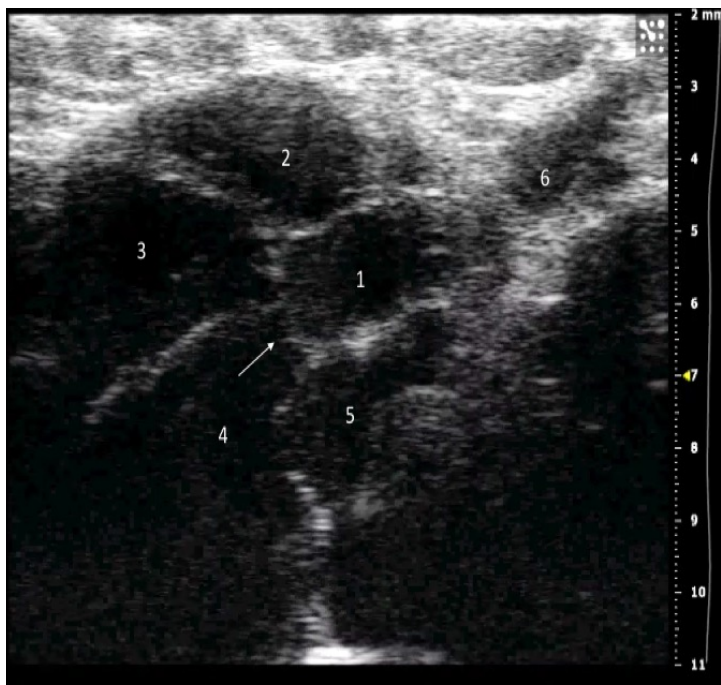


Abbildung 15: Ultraschallbild der Aortenklappe

Durch die parasternale Echokardiografie wurde die *Aorta ascendens* (1), die Aortenklappe (Pfeil), der rechte Vorhof (2), die rechte Kammer (3), sowie die linke Kammer (4) und der linke Vorhof (5) und die *A. carotis communis* (6) dargestellt.

8.3. Thrombozytenzahlangleichung durch Busulfanbehandlung

Die absolute Thrombozytenzahl in einer MyH9-defizienten Maus ist um rund ein Drittel geringer, als die einer Pf4-Cre x MyH9-negativen Maus. Um in den Versuchen die Thrombozytenzahlen des Wildtyps an die Cre-positiven Tiere anzugleichen, wurden die Wildtyp-Mäuse im Vorfeld mit in 0,9 % NaCl verdünntem Busulfan (Busulfan, Sigma-Aldrich) behandelt. Den Knockout-Tieren wurde ein gleiches Volumen an NaCl über die Schwanzvene verabreicht.

Busulfan ist ein synthetisches Zytostatikum, das zur Gruppe der bifunktionellen Alkylantien gehört. Der Wirkstoff interagiert mit der zellulären DNA und alkyliert diese. Somit schädigt er besonders proliferierende Zellen des Knochenmarks, unter anderem die Megakaryozyten. Es wird klassischerweise als Arzneimittel bei Krebserkrankungen (Chronische Myeloische Leukämie) oder als Konditionierung vor einer hämatopoetischen Stammzelltransplantation eingesetzt. Die Erzeugung einer Thrombozytopenie durch die Applikation von Busulfan wurde bereits an einem *in vivo* Model beschrieben [192].

50 mg des Busulfan-Pulvers wurden in 2 ml Polyethylen Glycol 400 (Poly(ethylene glycol), Aldrich) auf einem Schüttler bei Raumtemperatur für eine Stunde gelöst und anschließend auf 70 °C erhitzt, bis das Busulfan vollständig gelöst war. Kurz vor der Injektion, wurde die Lösung mit NaCl zu einer finalen Konzentration von 2,5 µg/µl (1 : 10) verdünnt. Intraperitoneal wurden den Pf4cre x MyH9-negativen Mäusen 20 mg Busulfan/kg an Tag 1 und 3 injiziert. 14 Tage nach der ersten Injektion war die Thrombozytenanzahl der Mäuse um rund 30 % reduziert, was durch eine sehr geringvolumige Blutabnahme aus der *V. facialis* und durch Messen der Thrombozytenzahl unmittelbar vor der Operation überprüft wurde.

8.4. Schwanzveneninjektion

Die Verabreichung der Bakterien erfolgte intravenös über die beiden Kollateralvenen (*Venae coccygeae laterales*) des Schwanzes. Dafür wurde ein 10 cm langes Stück eines Polyethylenschlauchs (Fine Bore Polyethene Tubing, 0,28 mm ID 0,61 mm OD, Smiths Medical International Ltd., Hythe, UK) abgeschnitten und in dessen vorderes Ende der Konus einer 30 G Kanüle (BD Mikrolance Becton Dickson GmbH, Franklin Lakes, USA) und in das hintere Ende eine intakte 30 G Kanüle gesteckt. Eine mit 0,9 %-NaCl (Isotone

Kochsalzlösung 0,9 %, B.Braun, Melsungen) gefüllte 1 ml Spritze (Injekt-F, B.Braun, Melsungen) wurde auf die hintere Kanüle aufgesetzt und der Katheter auf Durchgängigkeit überprüft und gespült. Dabei ist wichtig, dass sich keine Luftblasen in der Spritze und im Katheter befinden. Die Maus wurde zur Injektion in eine Fixationsvorrichtung (Injektionskäfig, Typ Broome HAR-52-04, Föhr Medical Instruments GmbH, Seeheim-Jugenheim) gesetzt, bei der nur der Schwanz der Maus zugänglich war. Durch leichten Fingerdruck am Schwanzansatz wurde die Vene gestaut und mithilfe eines Nadelhalters der Katheter in die Vene platziert. Das Zurückfließen des Blutes und das leichte Applizieren ohne Druck waren Kontrolle für die korrekte Lage des Katheters.

8.5. Immunhistologie

8.5.1. Anfertigung der histologischen Schnitte

Zum Schneiden der Präparate wurde ein Kryotom (CryoStar NX70 Kryostat) verwendet. Die Präparate wurden zunächst aus dem Cryomold herausgelöst und mit Tissue-Tek auf einen Stempel bei -20 °C in der Kammer des Kryotoms aufgesetzt. Nach Aushärtung des Tissue-Teks war das Präparat gut fixiert und konnte an die entsprechende Vorrichtung angebracht werden. Die Temperatur des Stempels wurde auf -25 °C und die des Schneidmessers auf -18 °C eingestellt. Zunächst wurde das Präparat mit einer Schnitttiefe von 50 µm bis zur Aortenklappe angeschnitten. Stellenweise wurde ein Schnitt auf einen Adhäsions-Objektträger (Thermo Scientific, Superfrost Plus, Gerhard Menzel GmbH, Braunschweig) aufgenommen und die aktuelle Position unter einem Lichtmikroskop kontrolliert. Ab Erreichen der Aortenklappe wurde die Schnittdicke auf 5 µm reduziert und die Schnitte auf einen Objektträger aufgenommen, die bis zur Färbung bei -20 °C in histologischen Boxen aufbewahrt wurden.

8.5.2. Immunhistologische Färbung des Biofilmes

Die Färbung des Biofilmes, die in dieser Arbeit verwendet wurde, ist in der Arbeitsgruppe bereits etabliert und erfolgreich eingesetzt worden. Sie erfolgte in einer lichtundurchlässigen Färbekammer, in die seitlich feuchte Zellulose-Tücher gelegt waren, um dem Austrocknen der Präparate vorzubeugen. Die Objektträger wurden in die Färbekammer gelegt und 10 Minuten aufgetaut. Danach wurden die einzelnen Herzklappenschnitte vorsichtig mit einem Fettstift umrandet, um die

Lösungen später an ihrem Platz zu halten und ein Auslaufen zu verhindern. Zu Beginn der Färbung erfolgte eine dreiminütige Fixierung der Präparate mit 4%igem Formaldehyd. Anschließend wurden die Objektträger mit einer Waschlösung aus 1%igem PBS (Life Technologies Corporation, Grand Island, NY, USA) und 0,1 % Tween (Tween 20, Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim) jeweils dreimal für 5 Minuten in Waschküvetten gewaschen, wobei nach jedem Waschschrift die Waschlösung gewechselt wurde. Daraufhin wurde zuerst mit 10 % Donkey Serum (Donkey Serum, Sigma Aldrich, Missouri, USA) und nach 15 Minuten zusätzlich für 45 Minuten mit 10 % Goat Serum (Normal goat serum ready-to-use, Invitrogen Cooperation, Frederick, MD, USA) bei Raumtemperatur geblockt, um unspezifische Antikörperbindungen zu vermeiden. Danach wurden die Seren vorsichtig vom Objektträger abgeklopft und die primären Antikörper für eine Stunde bei Raumtemperatur aufgetragen. Für die primären Antikörper wurden drei verschiedene Antikörper verwendet. Um die Thrombozyten anzufärben wurde das Antigen CD42b (Purified Rat Anti-Mouse GPI α (Cd42b) Monoclonal Antibody M043-0, 0,5 mg/ml, Emfret Analytics, Würzburg) markiert und der Primärantikörper 1 : 50 verdünnt. Um Fibrinogen anzufärben, wurde ein Antikörper (Sheep Anti Human Fibrin(ogen) Polyclonal Antibody, Purified, 5 mg/ml, Bio-rad Laboratories), der gegen menschliches Fibrinogen gerichtet ist, verwendet und dafür 1 : 100 verdünnt. *S. aureus* wurde mit einem Antikörper (Anti-Staphylococcus aureus Antibody, abcam) aus der Ratte angefärbt und in einer Verdünnung von 1 : 200 verwendet. Nach der Einwirkzeit erfolgte wiederum das Waschen der Objektträger (s.o.). Anschließend wurden die fluoreszierenden Sekundärantikörper in der Verdünnung 1 : 200 auf die Objektträger appliziert. Dazu wurde zur Detektion des CD42b Antikörpers ein Alexa Fluor (AF) Sekundärantikörper verwendet (Goat Anti-Rat IgG H&L (Alexa Fluor 488), Invitrogen), zur Markierung des Fibrinogens ein AF 594 Sekundärantikörper (Donkey Anti-Sheep IgG H&L (Alexa Fluor 594), Life Technologies, USA) und zum Sichtbarmachen des *S. aureus* ein AF 647 Sekundärantikörper (Goat Anti-Rabbit IgG H&L (Alexa Fluor 647), invitrogen). Anschließend wurde auf die Objektträger für drei Minuten eine mit PBS 1 : 1000 verdünnte Hoechst-Lösung (Hoechst33342, Thermo Fisher) pipettiert, um die Zellkerne anzufärben. Anschließend folgte der letzte Waschschrift und die Objektträger wurden mit drei Tropfen Eindeckmedium (Dako Fluorescent Mounting Medium, Dako North America, Inc., Carpinteria, Ca, USA) und einem

Deckglas (Medite GmbH, Burgdorf) versehen. Die Lagerung der Objektträger erfolgte in Münchner Mappen bei 4°C.

Zusätzlich wurde sowohl eine Isotyp- als auch eine Negativkontrolle angefertigt. Für die Isotypkontrolle des CD42b-Antikörpers wurde eine IgG2a-Isotypkontrolle aus der Ratte (Rat IgG2a IsoControl, eBioscience) verwendet. Als Isotypkontrolle des Fibrinogens wurde ein polyklonales Schaf-IgG (Purified Sheep IgG, R&D) und zur Kontrolle des *S. aureus*-Antikörpers ein Kaninchen-IgG (Negative Control Rabbit Immunglobulin, Dako) eingesetzt. Die Isotypkontrollen wurden anstelle der primären Antikörper aufgetragen und in gleicher Konzentration und identischer Inkubationszeit verwendet. Außerdem wurde die Färbung durch eine Negativkontrolle kontrolliert. Dafür wurde nur der sekundäre Antikörper aufgetragen.

Tabelle 4: Übersicht der verwendeten Antikörper

Antigen	Antikörper	Hersteller	Konzentration	Verdünnung
CD42b	Rat Anti -Mouse M043-0 Monoclonal Antibody	Emfret Analytics	0,5 mg/ml	1 : 50
Fibrin(ogen)	Sheep anti human Fibrin(ogen) Polyclonal Antibody	Bio-rad Laboratories	5 mg/ml	1 : 100
<i>S. aureus</i>	Anti-staphylococcus aureus Antibody	Abcam	4 mg/ml	1 : 200
Antigen	Sekundärantikörper	Hersteller	Konzentration	Verdünnung
Cd42b	Goat Anti-Rat IgG H&L (Alexa Fluor 488)	Invitrogen	2 mg/ml	1 : 200
Fibrin(ogen)	Donkey Anti-Sheep IgG H&L (Alexa Fluor 594)	Invitrogen	2 mg/ml	1 : 200
<i>S. aureus</i>	Goat Anti-Rabbit IgG H&L (Alexa Fluor 647)	Invitrogen	2 mg/ml	1 : 200

8.5.3. Immunhistologische Färbung des Klappenendothels

Um zu überprüfen, ob das Endothel der Aortenklappe durch den Faden geschädigt worden war, wurde das Thrombozyten-Endothelzellen-Adhäsionsmolekül (PECAM-1, CD31) angefärbt. PECAM-1 wird in hohen Mengen an Endothelzellen exprimiert und dient daher als guter Indikator für die Integrität des Endothels.

Der Ablauf der Färbung entsprach dem der Färbung des Biofilms mit Modifikationen. Zum Blocken wurde 10%iges Goat Serum verwendet, das eine Stunde inkubiert wurde. Der primäre Antikörper, der PECAM-1 markiert (Purified Rat Anti-Mouse CD31, Bioscience), konnte ebenfalls eine Stunde

einwirken, ehe der Objektträger gewaschen und der sekundäre Antikörper (Goat anti Rat IgG H&L (Alexa Fluor 488), Invitrogen) für eine Stunde aufgetragen wurde.

Auch hier wurde neben der Negativkontrolle, eine Isotypkontrolle (Rat IgG2a κ , Isotypkontrolle, Invitrogen) angefertigt.

8.5.4. Aufnahme und Auswertung der Aortenklappen

Die Aortenklappen wurden mit einem Epifluoreszenzmikroskop (Axio Imager.M2, Carl Zeiss, Jena), einer AxioCamMRm Digitalkamera und der entsprechenden Software (Axiovision) aufgenommen. Mit der Mosaik-Funktion wurde mit dem 40x-Objektiv (Zeiss MicroImaging GmbH) der gesamte Klappenschnitt abgescannt und aus Einzelbildern von 0,256 x 0,256 cm und einer Pixelzahl von 5136 x 4784 zusammengesetzt.

Mit der Software Imaris 8.4 (Bitplane AG, Zürich, Schweiz) wurden die abfotografierten Bilder ausgewertet. Die Größe der Thrombozyten- und Bakterienflächen wurde mit der Funktion „Surface“ berechnet. Außerdem wurde mit der Funktion „Colocalization“ Flächen der sich überschneidenden Signale von Thrombozyten und Bakterien erstellt.

9. Statistik

Für die statistische Analyse wurde das Programm GraphPad Prism (Version 5.1, San Diego, CA, USA) herangezogen. Die Graphen wurden entweder mit GraphPad Prism oder mit Excel erstellt.

Beim Vergleich zwischen nativen und para-Nitroblebbistatin-inhibierten Thrombozyten und der Gerinnsel vor und nach Fluss wurden zur Auswertung der Mittelwerte Tests für abhängige Stichproben gewählt. Bei der Analyse zwischen Thrombozyten von Wildtyp-Tieren und MyH9-defizienten Thrombozyten bzw. keine Thrombozyten wurde der Test für unabhängige Stichproben verwendet. Zunächst wurden die Daten anhand des Shapiro-Wilk-Tests auf Normalverteilung geprüft. Ergab die Analyse durch den Shapiro-Wilk-Test bei den abhängigen Stichproben keine Normalverteilung, wurde der nicht-parametrische Wilcoxon-Test verwendet. Bei unabhängigen, nicht-normalverteilten Stichproben folgte der nicht-parametrische Mann-Whitney-U-Test und im Falle einer Normalverteilung der Daten der F-/Levene-Test, der die Varianzhomogenität der Daten prüfte.

Diese ist Voraussetzung beim t-Test für unabhängige Stichproben. Lagen gleiche Varianzen vor, wurde ein ungepaarter t-Test angewandt. War dies nicht der Fall, wurde eine Welch-Korrektur vorgenommen.

Um mehrere Gruppen zu vergleichen, wurde bei unabhängigen Gruppen die *one way ANOVA* angewandt. Auch hier wurden der Shapiro-Wilk-Test und der Levene-Test zur Prüfung auf Normalverteilung bzw. Varianzhomogenität vorgeschaltet. Handelte es sich um eine nicht-parametrischen Verteilung wurde der Kruskal-Wallis-Test verwendet. Die Analyse mehrerer abhängiger Gruppen erfolgte durch die *Repeated Measures ANOVA*. Zum Vergleich der Gruppen untereinander und zur Neutralisierung der α -Fehler-Kumulation, wurde die Adjustierung nach Bonferroni angewandt.

Die Ergebnisse galten ab einem p-Wert $< 0,05$ als statistisch signifikant. Der p-Wert gibt Auskunft über die Irrtumswahrscheinlichkeit eines statistischen Tests und wird maßgeblich von der Stichprobenanzahl beeinflusst. Er gibt daher nicht an, wie stark ein Effekt zu beurteilen ist. Aus diesem Grund wurde bei unabhängigen Stichproben die Effektstärke, der *Cohen's d*, berechnet, die sich aus der mittleren Differenz zweier Gruppen geteilt durch die gepoolte Standardabweichung ergibt [193]. Im Falle von abhängigen Stichproben wurde zur Einschätzung der Effektstärke der *Cohens's dz* hinzugezogen. Dieser berechnet sich aus den mittleren Differenzen zweier Gruppen geteilt durch die Standardabweichung der Differenzen. Die Fallzahlen für die *in vitro* Versuche wurden in dieser Arbeit so festgelegt, dass bei einem Mindesteffekt *Cohen's dz* von 1,156 eine Power $\geq 80 \%$ besteht.

Die Mittelwerte in den Graphen wurden im Falle einer Normalverteilung der Werte als arrhythmisches Mittel mit dem Standard Fehler des Mittelwertes (SEM) angegeben. Bei nicht-normalverteilten Werten wurde dazu der Median mit Spannweite gewählt.

V. ERGEBNISSE

1. Fluoreszenzmikroskopische Analyse von Thrombozyten und der Beteiligung ihrer kontraktilen Kräfte bei der Interaktion mit Bakterien im Gerinnsel

Der erste Teil der Arbeit befasst sich mit der Frage, inwiefern Thrombozyten in einem Gerinnsel mit Fibrin und Bakterien interagieren und welche Rolle dabei ihre Kontraktilität spielt. Dazu wurden *in vitro* Gerinnsel aus Fibrin, Thrombozyten und *S. aureus* in eine μ -Kammer pipettiert und anschließend unter einem konfokalen Mikroskop analysiert. Neben Wildtyp-Thrombozyten von Tieren der Linie C57BL/6J, wurden zum Vergleich auch die Thrombozyten derselben Tiere mit para-Nitroblebbistatin inhibiert. Das para-Nitroblebbistatin hemmt das Myosin IIa in den Thrombozyten. Diese können zwar Pseudopodien bilden, jedoch keine kontraktilen Aktomyosinbündel (siehe II.2). Der Thrombozyt ist deshalb in seiner Kontraktilität gehemmt und weder fähig zu migrieren noch ein Fibringerinnsel zu retrahieren [9, 71].

1.1. Thrombozyten strukturieren das Fibrinnetzwerk

In den Übersichtsaufnahmen zeigten die Wildtyp-Gerinnsel ein verstärktes Fluoreszenzsignal im Vergleich zu den inhibierten Gerinnseln. Ebenso waren deutliche Einziehungen des Fibrin-Netzwerks an beiden Rändern der μ -Kammer zu erkennen. Das Fibrinnetzwerk der Gerinnsel mit inhibierten Thrombozyten war in der Übersicht gleichmäßiger und unstrukturierter. Auch das Fluoreszenzsignal war homogener über das gesamte Gerinnsel verteilt. Das Gerinnsel füllte die gesamte μ -Kammer aus und zeigte keine Einziehungen des Fibrinnetzwerkes an den Rändern (siehe Abbildung 16). Die gleichen Beobachtungen konnten bei einer höheren Vergrößerung gemacht werden. Die Fibrinfasern im Wildtypgerinnsel erschienen dicker und komprimierter als im Gerinnsel mit Blebbistatin-inhibierten Thrombozyten. Die Thrombozyten im Wildtypgerinnsel bildeten kleine Aggregate und retrahierten die Fibrinfasern, die sie auf ihrer Oberfläche akkumulierten. Dadurch formten sie Zentren, die radiär Fibrinfasern entließen. Dieser Effekt konnte im Fibrinnetzwerk des Blebbistatin-Gerinnsels nicht beobachtet werden. Daraus lässt sich schließen, dass Thrombozyten ein

Fibringerinnsel durch Kontraktion der Fibrinfasern strukturieren und dazu ihre kontraktile Kräfte erforderlich sind.

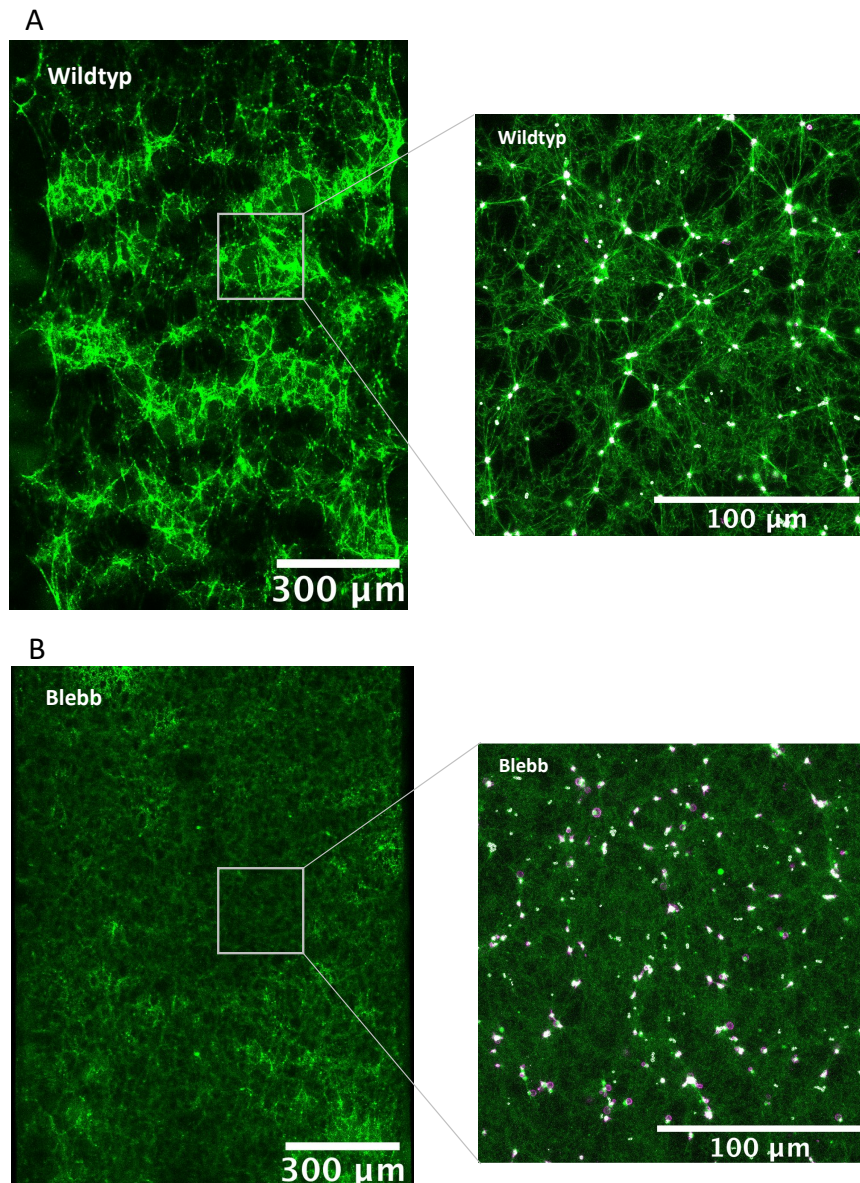


Abbildung 16: Repräsentative Aufnahmen der Gerinnsel in der µ-Kammer

A: Wildtyp-Thrombozyten strukturierten das Fibrinnetzwerk, indem sie die Fibrinfasern kontrahierten und komprimierten. Dies wurde durch ein verstärktes Fluoreszenzsignal und durch Einziehungen des Fibrinnetzwerkes an den Rändern deutlich. Außerdem bildeten sie Aggregate und retrahierten das Fibrin. Dadurch entstanden Zentren, von denen aus die Fibrinfasern ausstrahlten.

B: Das Fibrinnetzwerk mit para-Nitroblebbistatin-inhibierten Thrombozyten war homogener in seiner Struktur und seinem Fluoreszenzsignal. Es füllte die gesamte µ-Kammer aus und zeigte keine Einziehungen. Die Gerinnsel wiesen keine Thrombozyten-Zentren auf.

Aufnahmen mit einem konfokalen Mikroskop in 100x- bzw. 400x-Vergrößerung, Max. Intensity Projection, 30 Bilder à 0,8 µm, Grün = Fibrin (AF 594), Weiß = MRSA (eFluor 670), Magenta = Thrombozyten (DyLight 488)

1.2. Thrombozyten interagieren im Gerinnsel mit Bakterien

In vorangegangenen Arbeiten dieser Forschungsgruppe konnte bereits gezeigt werden, dass Thrombozyten *in vitro* auf einer mit Fibrin(ogen) beschichteten Oberfläche Bakterien im Rahmen ihrer Migration einsammeln, bündeln und auf ihrem Pseudonukleus anhäufen können [9]. In dieser Arbeit wurde nun das Bündeln der Bakterien durch Thrombozyten in einem 3D-Fibrinnetzwerk analysiert. Mit der Software „Imaris“ konnte anhand der Funktion „Distance Transformation“ der Abstand zwischen den Thrombozyten und den Bakterien bestimmt werden (siehe Abbildung 17). Bei einem Abstand von 0 μm grenzten Bakterien und Thrombozyten aneinander an und kolokalisierten somit. Anhand der Funktion „Surface“ wurde außerdem das Volumen der Bakterienaggregate ermittelt. Zur Analyse wurden je fünf Felder (212,55 μm x 212,55 μm x 24 μm) pro μ -Kammer unter 400-facher Vergrößerung mit einem konfokalen Mikroskop aufgenommen und ausgewertet. Von den fünf Feldern wurde jeweils der Mittelwert als $n = 1$ verwendet.

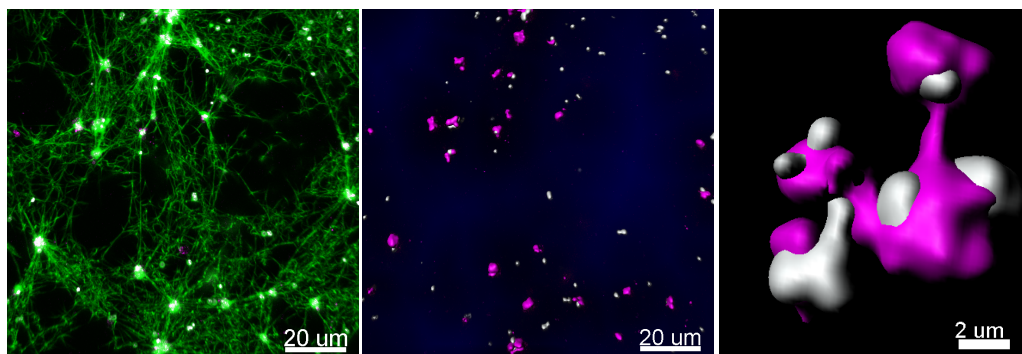


Abbildung 17: Analyse der Gerinnsel anhand der Imaris Software

Mit der Software „Imaris“ wurde anhand der Funktion „Distance Transformation“ ermittelt, ob Bakterienaggregate mit Thrombozyten assoziiert waren. In der weiteren Analyse konnte mit der Funktion „Surface“ die Größe der jeweiligen Bakterienaggregate berechnet werden.

Links: Ausschnitt einer originalen Aufnahme mit einem konfokalen Mikroskop

Mitte: Derselbe Ausschnitt ohne die Darstellung von Fibrin und nach Erstellung der Volumina für Thrombozyten und MRSA anhand der „Surface“-Funktion von Imaris

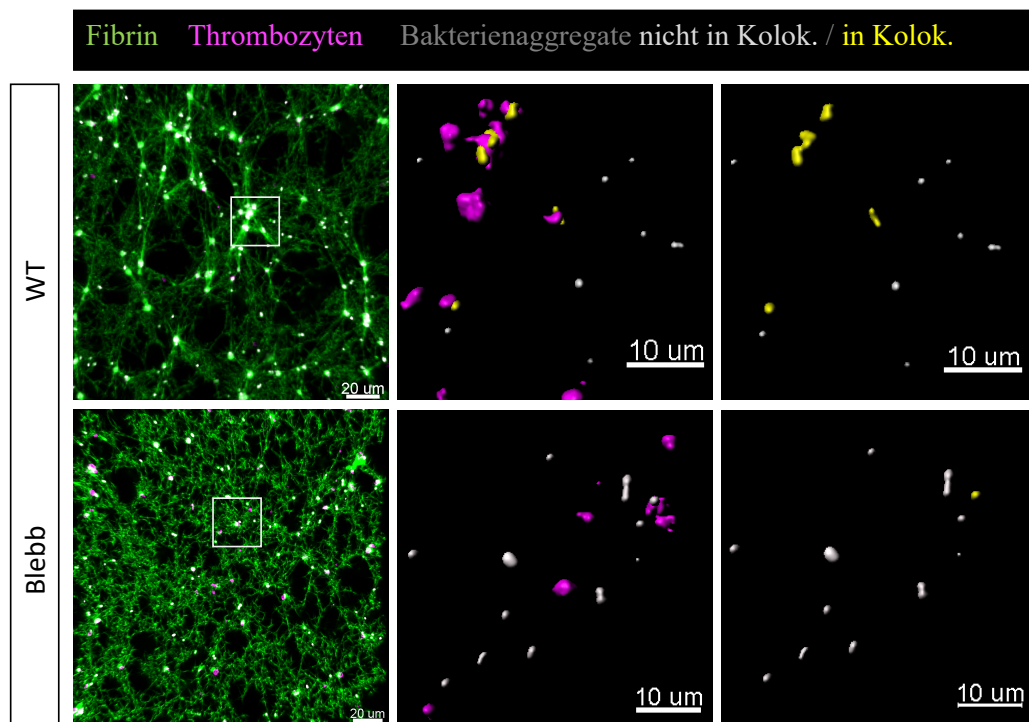
Rechts: Nahaufnahme eines Aggregats aus Thrombozyten und MRSA nach Rekonstruktion durch Imaris

Aufnahmen mit einem konfokalen Mikroskop, 400x-Vergrößerung, Max. Intensity Projection, 30 Bilder à 0,8 μm und Darstellung von Ausschnitten mit Rekonstruktionen der Imaris Software, Grün = Fibrin (AF 594), Magenta = Thrombozyten (DyLight 488), Weiß = MRSA (eFluor 670)

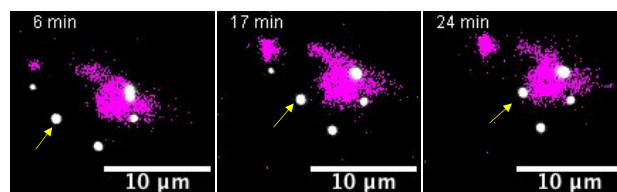
1.2.1. Die Interaktion von Thrombozyten mit Bakterien im Fibringerinnsel ist Myosin IIa abhängig

Nachdem für Thrombozyten und Bakterien Volumina rekonstruiert worden waren, wurden diejenigen Bakterienaggregate identifiziert, die unmittelbar an Thrombozyten angrenzten. Dabei konnte anhand der Analysen festgestellt werden, dass im Wildtyp-Gerinnsel durchschnittlich 68,8 % der Bakterien an Thrombozyten gebunden waren. Im Gegensatz dazu waren in den inhibierten Gerinnseln im Mittel lediglich 26,5 % der Bakterien mit Thrombozyten assoziiert. Diese statistisch hoch signifikante ($p = 0,004$) Differenz wird durch die Abbildung 18 illustriert. Das Inhibieren des Myosin IIa hatte demzufolge einen sehr starken Effekt (*Cohen's d* = 1,59) auf den Anteil der von Thrombozyten gebundenen Bakterien im Gerinnsel. Im Umkehrschluss zeigte sich dadurch, dass Thrombozyten ihre kontraktilen Kräfte nutzen, um Bakterien im Gerinnsel effektiv an sich zu binden.

A



B



C

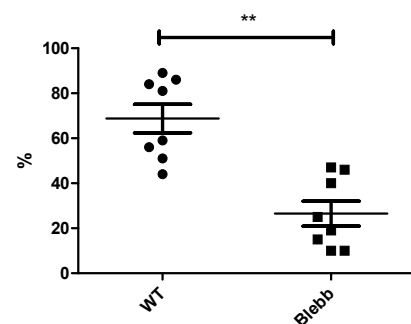


Abbildung 18: Repräsentative Aufnahmen zur Interaktion von Thrombozyten und Bakterien

A Kolokalisierende Bakterien: Die Bakterien in den Wildtyp-Gerinnseln kolokalisiert in der Mehrzahl der Fälle mit den Thrombozyten. Blebbistatin-inhibierte Thrombozyten konnten das Fibrinnetzwerk nicht retrahieren. Bakterien und Thrombozyten grenzten in diesen Gerinnseln seltener aneinander an.

B Videosequenzen eines Thrombozyten im Gerinnsel: Der Thrombozyt zog das Bakterium (gelber Pfeil) mit der Zeit zu sich heran, bis das Bakterium schließlich mit dem Thrombozyten kolokalisierte.

C Anteil der mit Thrombozyten kolokalisierten Bakterienfläche: Im Wildtyp-Gerinnsel war mit im Mittel 68,8 % eine signifikant ($p = 0,004$) höhere Bakterienfläche mit Thrombozyten kolokalisiert als im Blebbistatin-Gerinnsel mit nur 26,5 %.

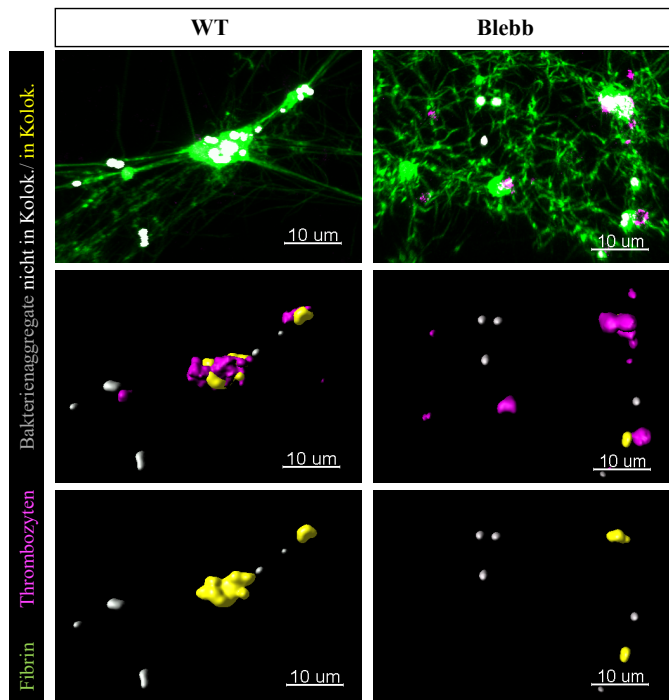
A+B: Zum besseren Verständnis wurden die Kanäle einzeln und überlagert dargestellt. Ausschnitt aus einer Aufnahme mit dem konfokalen Mikroskop, Max. Intensity Projection, 30 Bilder à 0,8 µm, Grün = Fibrin (AF 594), Magenta = Thrombozyten (Dylight 488), Gelb = MRSA mit Thrombozytenkontakt (eFluor 670), Weiß = MRSA ohne Thrombozytenkontakt (eFluor 670)

C: t-Test für abhängige Stichproben, Mittelwert \pm SEM, $n = 8$

1.2.2. Thrombozyten bündeln Bakterien im Gerinnsel

Anschließend wurde die Größe der Bakterienaggregate analysiert. Durchschnittlich war das Volumen der Bakterienaggregate in Kolokalisation mit Thrombozyten mit $30,8 \mu\text{m}^3$ beim Wildtyp-Gerinnsel etwa dreimal größer als beim Blebbistatin-Gerinnsel mit $9,7 \mu\text{m}^3$. Das entspricht einer sehr hohen Effektstärke (*Cohen's dz* = 2,64) und einem signifikanten Unterschied ($p = 0,001$). Daraus lässt sich ableiten, dass die Hemmung der Thrombozyten-Kontraktilität die Größe der gebundenen Bakterienaggregate stark negativ beeinflusst (siehe Abbildung 19). Beim Wildtyp-Gerinnsel betrug die Größe der Aggregate, die nicht in Kolokalisation mit Thrombozyten standen, im Schnitt $13,4 \mu\text{m}^3$ und war damit weniger als halb so groß wie die Bakterienaggregate in Kolokalisation. Die Bindung von Bakterien an Thrombozyten hatte demzufolge einen sehr starken (*Cohen's dz* = 1,72), statistisch signifikanten ($p = 0,01$) und positiven Effekt auf die Größe der Bakterienaggregate. Dieser Effekt unterstreicht die Annahme, dass Thrombozyten auch in einem 3D-Fibrinnetzwerk fähig sind, Bakterien zu bündeln. Auch im Blebbistatin-Gerinnsel sind die mit Thrombozyten assoziierten Bakterienaggregate mit $9,7 \mu\text{m}^3$ fast doppelt so groß wie diejenigen, die nicht mit Thrombozyten assoziiert waren. Diese waren im Schnitt $5,1 \mu\text{m}^3$ groß. Daraus geht hervor, dass auch der Kontakt zu Myosin IIa-inhibierten Thrombozyten die Aggregatsgröße der Bakterien stark erhöht (*Cohen's dz* = 1,55). Die Differenz war statistisch signifikant ($p = 0,018$) (siehe Abbildung 19). Vergleicht man die Größe der Bakterienaggregate zwischen den Gruppen, die nicht mit Thrombozyten kolokalisierten (siehe Abbildung 19), wird ersichtlich, dass diese im Wildtyp-Gerinnsel rund doppelt so groß ($p < 0,001$) waren wie im Blebbistatin-Gerinnsel. Die Kontraktionsfähigkeit der Thrombozyten fördert folglich die Größe der Bakterienaggregate nicht nur, wenn sie mit ihnen assoziiert sind, sondern üben auch ohne direkten Kontakt einen stark positiven Effekt (*Cohen's dz* = 2,97) auf die Aggregatsgröße aus. Dieser Effekt könnte durch das kompaktere Fibrinnetzwerk der Wildtyp-Gerinnsel zustande kommen. Durch Kontraktion komprimieren die Thrombozyten das Fibrin und aggregieren dadurch die auf den Fibrinfasern lokalisierten Bakterien.

A



B

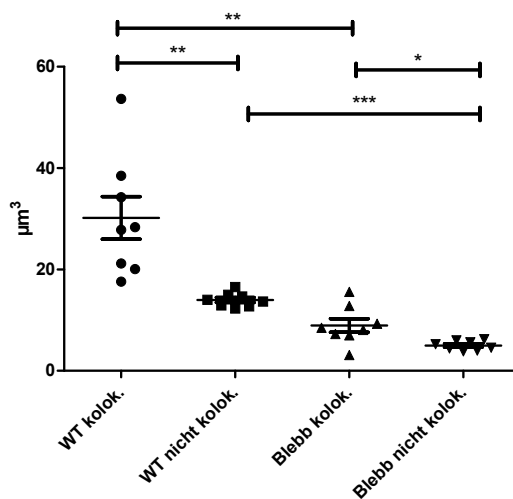


Abbildung 19: Größe der Bakterien-Aggregate in den Gerinnseln

A Repräsentative Aufnahmen von Gerinnseln mit Bakterien-Thrombozyten-Aggregaten

B Mit Thrombozyten assoziierte Bakterienaggregate waren beim Wildtyp rund dreimal größer als beim Blebbistatin-Gerinnsel ($p = 0,001$). Außerdem waren Bakterienaggregate ohne Thrombozytenkontakt beim Wildtyp signifikant ($p = 0,01$) kleiner als solche, die mit Thrombozyten assoziiert waren. Auch im Blebbistatin-Gerinnsel waren die Bakterien in Kolokalisation mit Thrombozyten um 47,3 % signifikant ($p = 0,018$) größer als ohne Kolokalisation. Die Volumina der Bakterien ohne Thrombozytenkontakt waren beim Wildtyp im Mittel signifikant ($p < 0,001$) größer als im Blebbistatin-Gerinnsel.

A: Ausschnitt aus einer Aufnahme mit dem konfokalen Mikroskop, Max. Intensity Projection, 30 Bilder à 0,8 µm und Rekonstruktion der Volumina von Thrombozyten und MRSA mit der Imaris Software, Grün = Fibrin (AF 594), Magenta = Thrombozyten (DyLight 488), Weiß = MRSA ohne Thrombozytenkontakt (eFluor 670), Gelb = MRSA mit Thrombozytenkontakt (eFluor 670)

B: Repeated Measures ANOVA mit Post-hoc-Test nach Bonferroni, Mittelwert ± SEM, $n = 8$

1.3. Analyse der Gerinnsel unter Fluss-Bedingungen

Ein Ziel dieser Arbeit war es, die Bedeutung der Kontraktilität von Thrombozyten im Rahmen einer bakteriellen Infektion näher zu erforschen. Gerinnsel sind unter physiologischen Bedingungen stets dem Blutfluss und seinen damit einhergehenden Scherkräften ausgesetzt. Es war deshalb wichtig, die Wechselwirkungen dieser Kräfte in den Versuchsaufbau miteinzubeziehen und diesen unter Fluss-Bedingungen zu wiederholen. Besonders die kontraktilen Kräfte könnten im Hinblick auf das Festhalten von Bakterien unter Fluss-Bedingungen eine besondere Rolle spielen und eine stärkere Bedeutung haben als unter statischen Konditionen.

Zu diesem Zweck wurden die μ -Kammern an ein Pumpsystem angeschlossen und die Gerinnsel gespült (siehe IV.7.1.3). Nachfolgend wurden die Gerinnsel wiederum bezüglich der Kolokalisation von Bakterien und Thrombozyten, der Größe der Aggregate und ihrer absoluten Bakterienzahl analysiert und mit den statischen Gerinnseln verglichen.

1.3.1. Thrombozyten strukturieren Gerinnsel unter Fluss-Bedingungen

Beim Vergleich der Strukturen in Abbildung 20, hat sich das Fibrinnetzwerk beim Wildtyp-Gerinnsel nach Fluss kaum verändert. Es konnten, parallel zu den statischen Konditionen, die Thrombozytenzentren und die davon ausstrahlenden, verdichteten Fibrinfasern beobachtet werden. In der Struktur des Fibrins im Blebbistatin-Gerinnsel konnten größere Zwischenräume im Fibrinnetzwerk beobachtet werden. Dies zeigt, dass die Kontraktilität von Thrombozyten einen entscheidenden Einfluss auf die Fibrinstruktur hat. Durch das komprimierte Fibrinnetzwerk ist es in der Lage, dem Fluss standzuhalten. Werden Thrombozyten in ihren kontraktilen Kräften gehemmt, ist das Fibrinnetzwerk weniger stabil. Der Fluss kann Löcher in das Fibrinnetzwerk reißen.

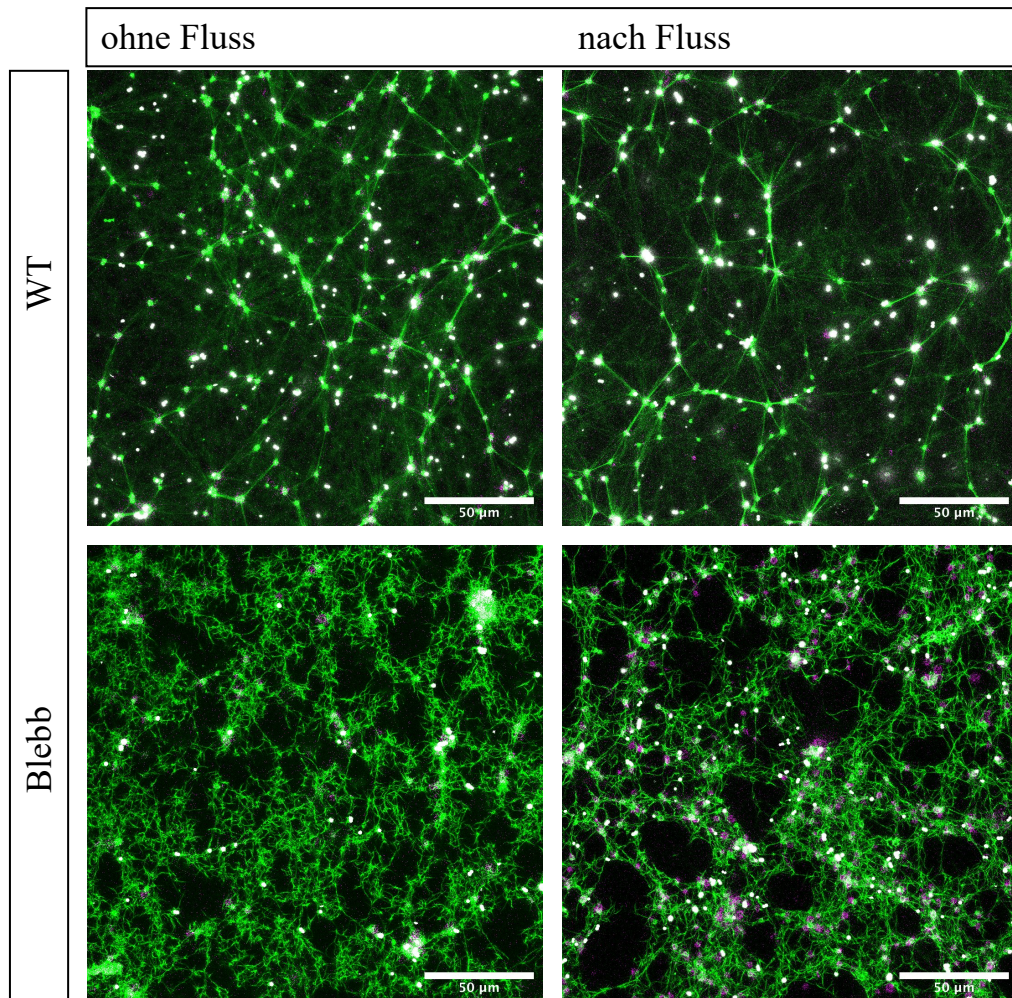


Abbildung 20: Struktur der Fibrinnetzwerke unter statischen und unter Fluss-Bedingungen

Das Fibrinnetzwerk veränderte sich beim Wildtyp-Gerinnsel nicht. Auch nach Fluss waren die Thrombozytenzentren gut sichtbar, von denen die komprimierten Fibrinfasern ausstrahlten. Beim Blebbistatin-Gerinnsel konnten nach Fluss größere Zwischenräume im Fibrinnetzwerk beobachtet werden.

Aufnahmen mit einem konfokalen Mikroskop, 400x-Vergrößerung, Max Intensity Projection, 30 Bilder à 0,8 µm, Grün = Fibrin (AF 594), Weiß = MRSA (eFluor 670), Magenta = Thrombozyten (DyLight 488)

1.3.2. Thrombozyten nutzen ihre kontraktilen Kräfte zur Immobilisierung der Bakterien unter Fluss

Zunächst wurde die Gesamtfläche der Bakterien in den Gerinnseln quantifiziert. Dies gab Aufschluss darüber, ob durch den Fluss Bakterien weggespült wurden oder ob das Gerinnsel eine Barriere darstellte, die die Bakterien trotz des Flusses einschloss und sie an einer Dissemination hinderte.

Wie aus Abbildung 21 ersichtlich, änderte sich das Gesamtvolumen der Bakterien pro ausgewertetem Feld ($212,55 \mu\text{m} \times 212,55 \mu\text{m} \times 24 \mu\text{m}$) im Wildtyp-Gerinnsel durch den Fluss kaum. Ohne Fluss betrug die Fläche an Bakterien durchschnittlich $2590,8 \mu\text{m}^3$. Die Erweiterung des Versuchs durch Flussbedingungen hatte auf die Anzahl der im Gerinnsel enthaltenen Bakterien keinen großen Effekt (*Cohen's* $dz = 0,514$). Sie reduzierte sich durch den Fluss nicht signifikant ($p = 0,217$) um $195,7 \mu\text{m}^3$ auf $2395,1 \mu\text{m}^3$ (siehe Abbildung 21). Im Gegensatz dazu, reduzierte sich im Gerinnsel mit Myosin IIa-inhibierten Thrombozyten das Gesamtvolumen der Bakterien durch den Fluss von $451,9 \mu\text{m}^3$ auf $285,3 \mu\text{m}^3$ (siehe Abbildung 21). Demnach hatte der Fluss beim Gerinnsel mit Blebbistatin-inhibierten Thrombozyten einen starken Einfluss (*Cohen's* $dz = 2,47$) auf die Gesamtfläche der Bakterien im Fibrinnetzwerk, die signifikant absank ($p < 0,001$).

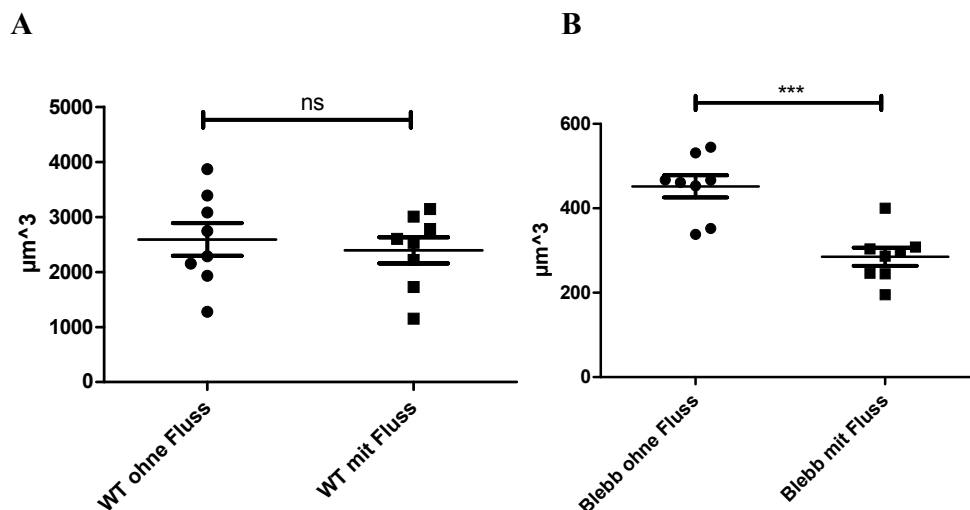


Abbildung 21: Gesamtfläche der Bakterien nach statischen und Fluss-Bedingungen

A: Der Unterschied in der gesamten Bakterienfläche pro Feld war beim Wildtyp-Gerinnsel ohne und nach dem Fluss nicht signifikant ($p = 0,217$).

B: Die Umstellung auf Flussbedingungen hatte beim Blebbistatin-Gerinnsel einen starken Effekt (*Cohen's* $dz = 2,47$). Durch den Fluss reduziert sich das Gesamtvolumen der Bakterien signifikant ($p < 0,001$).

t-Test für abhängige Stichproben, Mittelwerte \pm SEM, $n = 8$

Beim Wildtyp wurden im Schnitt 6,1 % der Bakterien durch den Fluss aus den Gerinnseln gespült. Beim Gerinnsel mit Blebbistatin-inhibierten Thrombozyten verringerte sich das Gesamtvolumen der Bakterien um 36,3 % (siehe Abbildung 22). Dadurch wird deutlich, dass die Inhibition der Kontraktionsfähigkeit von Thrombozyten einen starken Effekt (*Cohen's* $dz = 1,82$) auf den Anteil der ausgespülten Bakterien hat. Im Fibrinnetzwerk mit Myosin IIa-gehemmten

Thrombozyten wurde durch den Fluss ein signifikant ($p = 0,002$) höherer Anteil an Bakterien ausgespült. Dies bedeutet, dass die Strukturierung des Fibrinnetzwerkes und die Bildung von Bakterienaggregaten durch die Kontraktionsarbeit der Thrombozyten einer Dissemination der Bakterien entgegenwirkt.

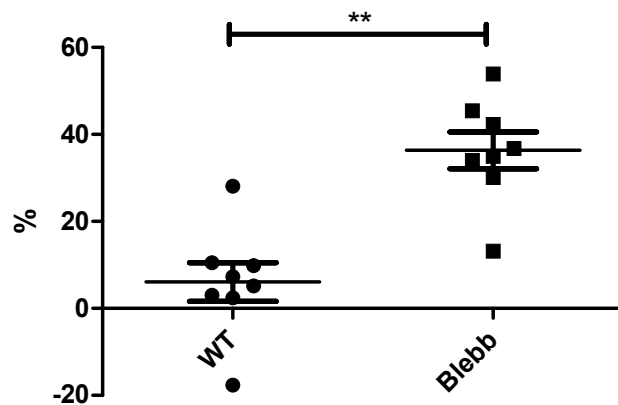


Abbildung 22: Durch den Fluss ausgespülter Anteil der Bakterienfläche

Im Mittel wurden beim Wildtyp durch den Fluss 6,1%, beim Blebbistatin-Gerinnsel 36,3% der Bakterien aus dem Gerinnsel gespült. Die Differenz von 30,2 Prozentpunkten hat einen starken Effekt (*Cohen's dz* = 1,82) und ist höchst signifikant ($p = 0,002$).

t-Test für abhängige Stichproben, Mittelwerte \pm SEM, $n = 8$

1.3.3. Thrombozyten binden Bakterien auch unter Fluss-Bedingungen

Als Nächstes wurde untersucht, ob die Fluss-Bedingungen Einfluss auf die Bindung zwischen den Thrombozyten, den Bakterien und dem Fibrin im Gerinnsel hatten. Dazu wurde der Anteil der Bakterien quantifiziert, der an Thrombozyten gebunden war und mit den statischen Gerinnseln verglichen. Die Fläche der Bakterien in Kolo-kalisation mit Thrombozyten gemessen an der Gesamtfläche der Bakterien war beim Wildtyp-Gerinnsel sowohl ohne als auch mit Fluss, nahezu identisch. Sie betrug durchschnittlich 68,8 % bzw. 68,0 % (siehe Abbildung 23). Der Fluss nahm demnach keinen Einfluss (*Cohen's dz* = 0,07) auf das Verhältnis der Bakterien mit und ohne Thrombozytenkontakt im Wildtyp-Gerinnsel. Die sehr geringe Differenz war dementsprechend nicht signifikant ($p = 1,0$). Beim Gerinnsel mit Blebbistatin-inhibierten Thrombozyten war ohne Fluss im Schnitt 26,5 % der Bakterienfläche in Kolo-kalisation mit Thrombozyten. Nach Fluss stieg diese Zahl auf 33,3 % (siehe Abbildung 23). Die Flussbedingungen hatten auf den Anteil der sich in Kolo-kalisation mit Thrombozyten befindlichen Bakterienfläche nur einen mittelgradigen Effekt

(*Cohen's* $dz = 0,52$). Die Effektstärke lag unter dem geplanten Mindesteffekt und konnte damit mit der verwendeten Fallzahl nicht als signifikant nachgewiesen werden ($p = 0,654$). Beim Vergleich zwischen den Wildtyp-Gerinnseln und den Blebbistatin-Gerinnseln nach Fluss, zeigte sich erneut der stark positive (*Cohen's* $dz = 1,74$) und signifikante ($p = 0,008$) Effekt der kontraktilen Kräfte der Thrombozyten auf den Anteil der Bakterienfläche in Kolokalisation (siehe Abbildung 23). Diese Ergebnisse zeigen, dass die Fluss-Bedingungen beim Wildtyp-Gerinnsel keine Auswirkungen auf den Anteil an gebundenen Bakterien haben. Thrombozyten sind auch unter Fluss in der Lage, durch ihre Kontraktionsarbeit Bakterien an sich und das komprimierte Fibrinnetzwerk zu binden. Diese Bindungen werden auch unter Fluss aufrechterhalten. In den Gerinnseln mit Myosin IIa-inhibierten Thrombozyten erhöhte sich der Anteil an Thrombozyten-gebundenen Bakterien durch den Fluss geringfügig. Daraus kann geschlossen werden, dass durch die Flussbedingungen mehr Bakterien entweder an Thrombozyten gebunden oder aus dem instabileren Fibrinnetzwerk gespült werden.

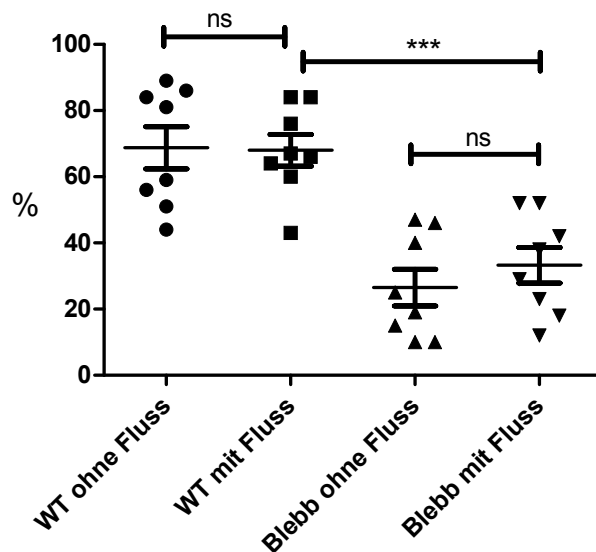


Abbildung 23: Der Anteil der Bakterienfläche in Kolokalisation mit Thrombozyten unter statischen und Fluss-Bedingungen

Der Anteil der mit Thrombozyten assoziierten Bakterienfläche war beim Wildtyp ohne bzw. nach Fluss nahezu identisch ($p = 1,0$). Beim Blebbistatin-Gerinnsel stieg der Anteil der Bakterienfläche in Kolokalisation mit Thrombozyten nach Fluss um 6,8 Prozentpunkte. Dieser nur mittelgradige Effekt (*Cohen's* $dz = 0,52$) hatte jedoch keinen signifikanten Einfluss ($p = 0,654$). Der Anteil der Bakterienfläche in Kolokalisation mit Thrombozyten war beim Wildtyp auch nach Fluss signifikant größer ($p = 0,008$) als beim Blebbistatin-Gerinnsel.

Repeated Measures ANOVA mit Post-hoc-Test nach Bonferroni, Mittelwert \pm SEM, $n = 8$

1.3.4. Die Größe der Bakterienaggregate wird durch Fluss nicht beeinflusst

Nachfolgend wurde untersucht, ob die Größe der Bakterienaggregate durch den Fluss beeinflusst wurde. Dazu wurde zuerst die Größe der Bakterienaggregate in den Gerinnseln nach Fluss analysiert. Anschließend wurden die Aggregatsgrößen nach Fluss-Bedingungen mit den statischen Gerinnseln verglichen. Das Volumen der Bakterienaggregate nach Fluss betrug beim Wildtyp in Kolokalisation im Mittel $30,2 \mu\text{m}^3$. Es war damit mehr als doppelt so groß wie die Bakterienaggregate ohne Kolokalisation mit $14,0 \mu\text{m}^3$ (siehe Abbildung 24). Waren Bakterienaggregate an Thrombozyten gebunden, hatte dies folglich auch unter Fluss-Bedingungen einen sehr starken und positiven Effekt (*Cohen's dz* = 1,42) auf die Größe der Aggregate. Der Effekt konnte als signifikant nachgewiesen werden ($p = 0,029$). Bakterienaggregate, die nicht mit Thrombozyten assoziiert waren, waren im Blebbistatin-Gerinnsel mit $5,0 \mu\text{m}^3$ durchschnittlich 44 % kleiner als die Bakterienaggregate, die mit Thrombozyten assoziiert waren. Diese waren im Schnitt $9,0 \mu\text{m}^3$ groß. Beim Blebbistatin-Gerinnsel konnte auch nach Fluss ein starker Effekt (*Cohen's dz* = 1,07) und ein signifikanter ($p < 0,05$) Unterschied zwischen den kolokalisierten und den nicht kolokalisierten Bakterienaggregaten detektiert werden.

Auch nach dem Fluss sind die Aggregate, die mit Thrombozyten assoziiert waren im Wildtyp signifikant größer ($p = 0,008$), als diejenigen im Blebbistatin-Gerinnsel. Hier zeigte sich erneut der starke Effekt (*Cohen's dz* = 1,82) der kontraktilen Kräfte von Thrombozyten hinsichtlich ihrer Fähigkeit, Bakterien in direktem Kontakt effizient zu bündeln. Gleiches galt für Bakterienaggregate, die nicht mit Thrombozyten kolokalisiert waren. Diese waren ebenfalls beim Wildtyp im Schnitt mit $14,0 \mu\text{m}^3$ mehr als doppelt so groß wie im Gerinnsel mit Blebbistatin-inhibierten Thrombozyten. Diese waren durchschnittlich $5,0 \mu\text{m}^3$ groß sind (siehe Abbildung 24). Auch nach Fluss beeinflusste die Kontraktilität der Thrombozyten somit die Größe der Bakterien nicht nur bei direktem Kontakt, sondern wirkte sich auch peripher sehr stark positiv und signifikant auf die Aggregatsgröße aus (*Cohen's dz* = 7,80, $p < 0,001$).

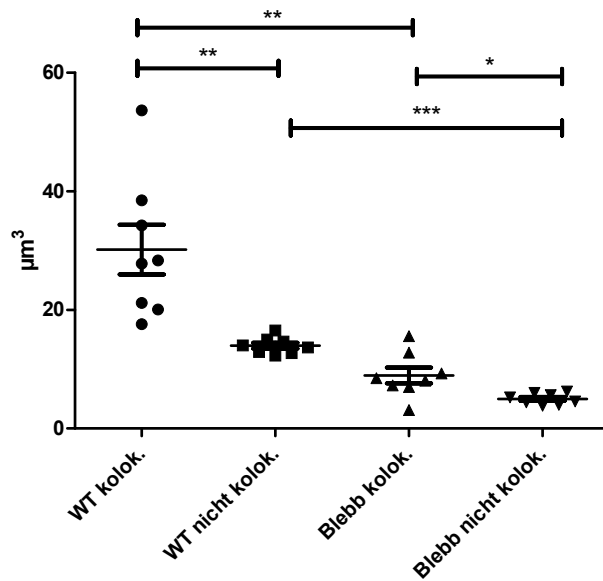


Abbildung 24: Die Größe der Bakterienaggregate unter Fluss-Bedingungen

Bakterienaggregate, die mit Thrombozyten kolokalisierten, waren nach Fluss im Wildtyp signifikant größer ($p = 0,008$) als im Blebbistatin-Gerinnsel. Die nicht mit Thrombozyten assoziierten Bakterienaggregate waren nach Fluss im Gerinnsel mit Wildtyp-Thrombozyten ebenfalls signifikant größer ($p < 0,001$) als im Gerinnsel mit Blebbistatin-inhibierten Thrombozyten. Außerdem zeigte die statistische Analyse einen signifikanten Unterschied in der Größe der Bakterienaggregate in Kolokalisation mit Thrombozyten und der Größe der Bakterienaggregate, die nicht in Kolokalisation mit Thrombozyten waren, sowohl beim Wildtyp ($p = 0,0288$) als auch beim Blebbistatin-Gerinnsel ($p < 0,05$).

Repeated Measures ANOVA mit Post-hoc-Test nach Bonferroni, Mittelwert \pm SEM, $n = 8$

Vergleich man das Volumen der Bakterienaggregate mit und ohne Kolokalisation mit Wildtyp-Thrombozyten zwischen den Gruppen ohne und nach Fluss, war der Effekt des Flusses auf die Größe der Bakterienaggregate beim Wildtyp zu vernachlässigen (*Cohen's d* = 0,07 bzw. *Cohens's d* = 0,04). Weder zeigten Aggregate, die mit Thrombozyten assoziiert waren, eine signifikante Differenz ($p = 1,0$), noch diejenigen, die nicht in Kontakt mit Thrombozyten standen ($p = 1,0$) (siehe Abbildung 25).

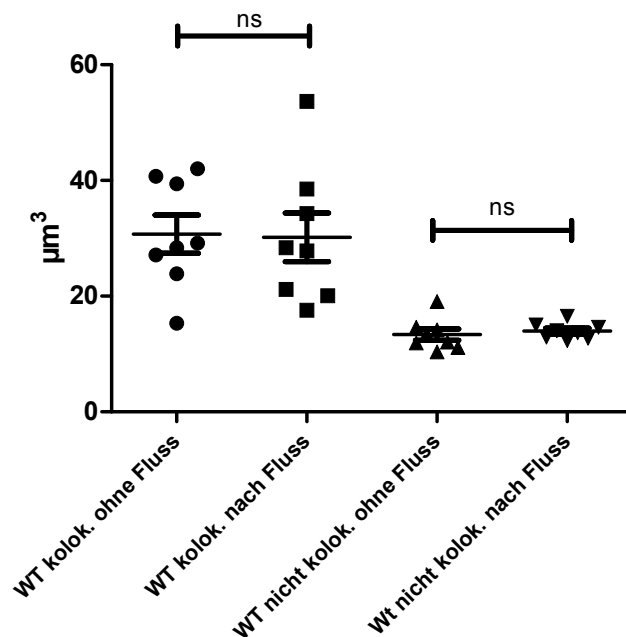


Abbildung 25: Größe der Bakterienaggregate unter statischen und Fluss-Bedingungen beim Wildtyp

Die Größe der Bakterienaggregate mit und ohne Kolokalisation von Thrombozyten wurde in den Wildtyp-Gerinnseln durch Fluss nicht beeinflusst ($p = 1,0$).

Repeated Measures ANOVA mit Post-hoc-Test nach Bonferroni, Mittelwert \pm SEM, $n = 8$

Beim Vergleich der Aggregatsgröße im Blebbistatin-Gerinnsel vor und nach dem Fluss ergaben die Auswertungen weder für die Bakterienaggregate in Kolokalisation ($p = 1,0$) noch für diejenigen ohne Kolokalisation ($p = 1,0$) ein signifikantes Ergebnis (siehe Abbildung 26). Folglich hatte der Fluss auch keine Auswirkungen auf die Größe der Bakterienaggregate beim Blebbistatin-Gerinnsel (*Cohen's d* = 0,15 bzw. 0,13).

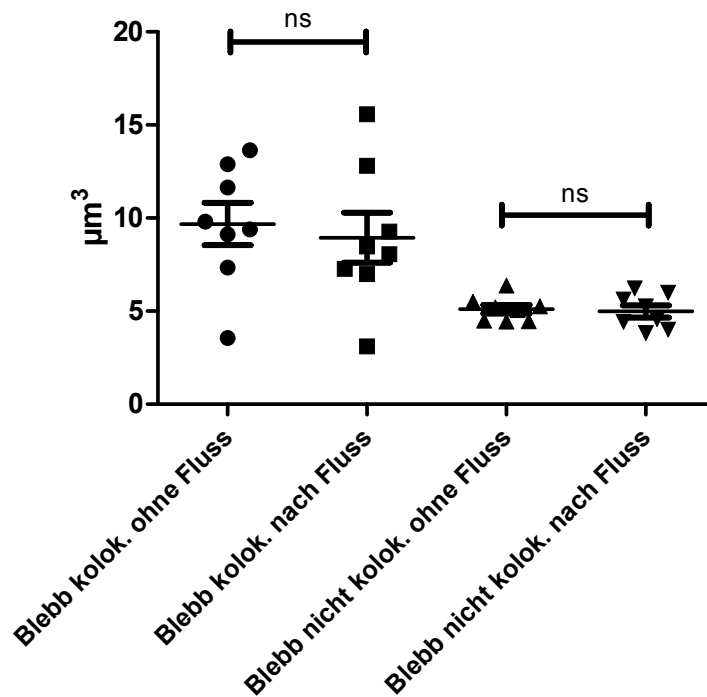


Abbildung 26: Größe der Bakterienaggregate unter statischen und Fluss-Bedingungen im Gerinnsel mit Blebbistatin-inhibierten Thrombozyten

Die Größe der Bakterienaggregate mit und ohne Kolokalisation von Thrombozyten wurde in den Blebbistatin-Gerinnseln durch Fluss nicht beeinflusst ($p = 1,0$).

Repeated Measures ANOVA mit Post-hoc-Test nach Bonferroni, Mittelwert \pm SEM, $n = 8$

Zusammenfassend zeigen diese Ergebnisse, dass Thrombozyten auch unter Fluss-Bedingungen ihre kontraktile Kräfte nutzen, um Bakterien zu bündeln. Die Fluss-Bedingungen haben dabei weder beim Wildtyp-Gerinnsel noch beim Gerinnsel mit Myosin IIa-inhibierten Thrombozyten einen Effekt auf die Größe der Bakterienaggregate.

1.4. Thrombozyten töten Bakterien im Gerinnsel ab

Thrombozyten sind in der Lage, Bakterien direkt abzutöten (siehe Kapitel II.3.1). Durch die Sekretion von bakteriziden Stoffen, greifen sie meist die Zellwand der Bakterien an. Zur Untersuchung, ob das Bündeln der Bakterien durch Thrombozyten einen Einfluss auf die Effizienz des Abtötens der Bakterien hat, wurden die Gerinnsel mit einer lebend/tot Färbung behandelt und analysiert. Der rote Farbstoff markierte dabei die toten Bakterien, der grüne Farbstoff die lebenden (siehe Abbildung 27).

Neben den Thrombozyten von Wildtyp Tieren der Linie C57BL/6J wurden zum Vergleich auch Thrombozyten von Tieren der Linie Pf4-Cre x MyH9^{fl/fl} im Assay

verwendet. Bei diesen Tieren ist das MyH9-Gen in den Megakaryozyten spezifisch inaktiviert [167]. Eine weitere Gruppe stellten die Gerinnsel ohne Thrombozyten dar. Sie gaben Aufschluss über den generellen Einfluss der Thrombozyten auf das Abtöten der Bakterien.

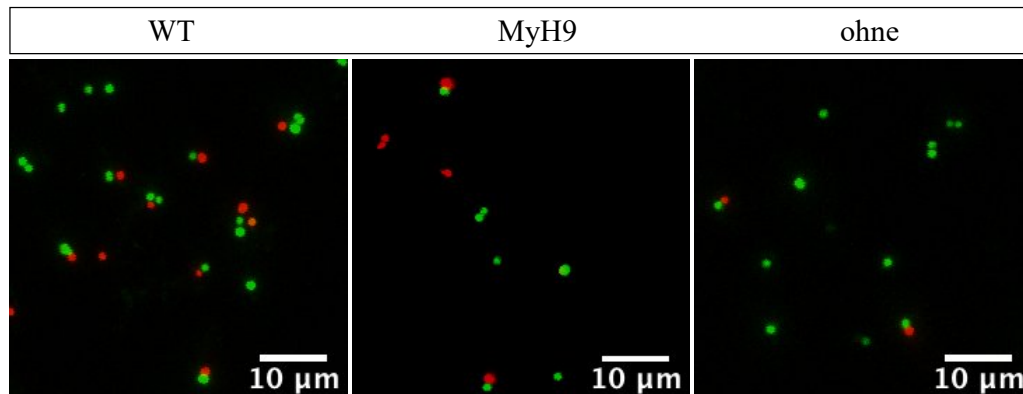


Abbildung 27: Repräsentative Aufnahmen der lebend/tot Färbung in den Gerinnseln

Die rote Färbung stellt die toten Bakterien dar, die grüne Färbung die lebenden.

Links: Wildtyp, **Mitte:** Myosin IIa-defiziente Thrombozyten, **rechts:** ohne Thrombozyten

Aufnahmen mit einem konfokalen Mikroskop, 400x-Vergrößerung (50,23 µm x 50,23 µm x 24 µm), Max Intensity Projection, 30 Bilder à 0,8 µm

Als Kontrolle wurde die Übernacht-Kultur mit der Bakteriensuspension ebenfalls gefärbt und analysiert. Die Analyse ergab einen durchschnittlichen Anteil toter Bakterien von 11,1 % in der Kontrolle und gab Aufschluss über die Menge an Bakterien, die von vornherein tot waren. Bei den Gerinnseln ohne Thrombozyten wurden im Mittel 11,2 % der Bakterien abgetötet. Das Fibrinnetzwerk an sich wirkte sich somit nicht (*Cohen's d* = 0,05, *p* = 1,0) auf die Vitalität der Bakterien aus. Befanden sich Thrombozyten in den Gerinnseln, war der Anteil toter Bakterien rund doppelt so groß wie in Gerinnseln ohne Thrombozyten. Die Präsenz von Thrombozyten – sowohl kontraktionsfähig als auch kontraktionsunfähig – hatte demzufolge einen starken (*Cohens's d* = 9.32 bzw. 3,37) und positiven Effekt auf den Anteil toter Bakterien im Gerinnsel. Die Differenz des Anteils der abgetöteten Bakterien in den Gerinnseln ohne Thrombozyten verglichen mit den Gerinnseln mit Wildtyp-Thrombozyten bzw. Thrombozyten einer Pf4cre x MyH9^{fl/fl}-Knockout-Maus war statistisch signifikant (*p* < 0,001). Daraus lässt sich schließen, dass Thrombozyten Bakterien im Gerinnsel abtöten. Im Wildtyp-Gerinnsel lag der Anteil der toten Bakterien im

Schnitt bei 25,8 % und beim Gerinnsel mit MyH9-defizienten Thrombozyten bei 24,2 % (siehe Abbildung 28). Beim Vergleich der beiden Gruppen wurde ersichtlich, dass die kontraktile Funktionsfähigkeit von Thrombozyten keinen Effekt (*Cohen's d* = 0,39) auf den Anteil an abgetöteten Bakterien im Gerinnsel hatte. Die Differenz war statistisch nicht signifikant ($p = 1,0$).

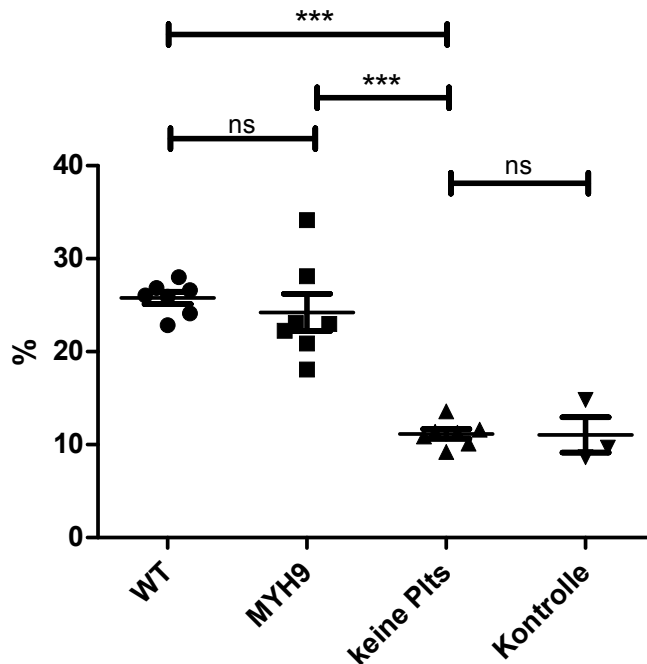


Abbildung 28: Anteil der abgetöteten Bakterien

Sowohl im Gerinnsel mit Wildtyp-Thrombozyten als auch im Gerinnsel mit Myosin IIa-defizienten Thrombozyten wurden signifikant ($p < 0,001$) mehr Bakterien abgetötet als im Gerinnsel ohne Thrombozyten. Im Wildtyp-Gerinnsel konnte kein signifikant höherer Anteil an toten Bakterien identifiziert werden als im Gerinnsel mit Myosin IIa-defizienten Thrombozyten ($p = 1,0$).

ANOVA mit Post-hoc-Test nach Bonferroni, Mittelwerte \pm SEM, $n = 7$

Zusammenfassend ergeben die Analysen der Gerinnsel, dass Wildtyp-Thrombozyten im Vergleich zu Blebbistatin-inhibierten oder Thrombozyten einer Pf4-Cre x MyH9^{fl/fl}-Knockout-Maus einen größeren Anteil an Bakterien und größere Bakterienaggregate bündeln und diese auch unter Flussbedingungen besser festhalten können. Es gibt keinen Hinweis darauf, dass die Kontraktilität der Thrombozyten beim Abtöten von Bakterien eine Rolle spielt.

2. Untersuchung der Retention von Bakterien durch Thrombozyten anhand des Transmigrationsassays

Wie die fluoreszenzmikroskopische Analyse der Gerinnsel zeigte, konnten die Thrombozyten *S. aureus* im Fibrinnetzwerk bündeln, trotz Fluss festhalten und abtöten. Sie waren dabei signifikant effektiver als Thrombozyten, die in ihrer Kontraktilität inhibiert waren. Darauf basierend wurde untersucht, ob die kontraktilen Kräfte der Thrombozyten auch unter statischen Bedingungen bei der Immobilisierung von Bakterien eine Rolle spielen.

Für den Transmigrationsassay wurde ein Gerinnsel aus Fibrin, Thrombozyten und *S. aureus* in einer Transmigrationskammer mit einer Filterporengröße von 1 µm pipettiert. Zum Vergleich wurden Wildtyp-Thrombozyten, mit Blebbistatin inhibierte Thrombozyten und Thrombozyten einer Pf4-Cre x MyH9^{fl/fl}-Knockout-Maus verwendet. Anschließend wurden die Gerinnsel in eine Well-Platte gesetzt, die mit S.O.C Medium gefüllt war und dessen darin enthaltene Glucose, ein Lockmittel für den *S. aureus* darstellte. Das S.O.C Medium wurde daraufhin auf Agar-Platten ausgestrichen, über Nacht inkubiert und die CFUs gezählt.

2.1. Das Fibrinnetzwerk verzögert die Transmigration der Bakterien

Zuerst wurde kontrolliert, ob die Bakterien generell den 1 µm großen Filter passieren konnten und von der Transmigrationskammer in das S.O.C Medium gelangten. Dazu wurden die Bakterien in Suspension mit PBS direkt in die Transmigrationskammer pipettiert und das S.O.C. Medium stündlich ausplattiert. Während nach einer Stunde noch keine Bakterien detektiert werden konnten, waren nach zwei Stunden die ersten Bakterien durch die Poren in das Medium gelangt. Bereits nach drei Stunden konnten im Schnitt 400 CFU/200 µl Medium gezählt werden. Im Vergleich dazu, erreichten im Transmigrationsassay mit Gerinnseln die ersten Bakterien das S.O.C. Medium nach einer Inkubationszeit von 5 Stunden (siehe Abbildung 29). Daraus kann geschlossen werden, dass das Fibrinnetzwerk eine Barriere für die Bakterien darstellt, die ihr Durchwandern verzögert.

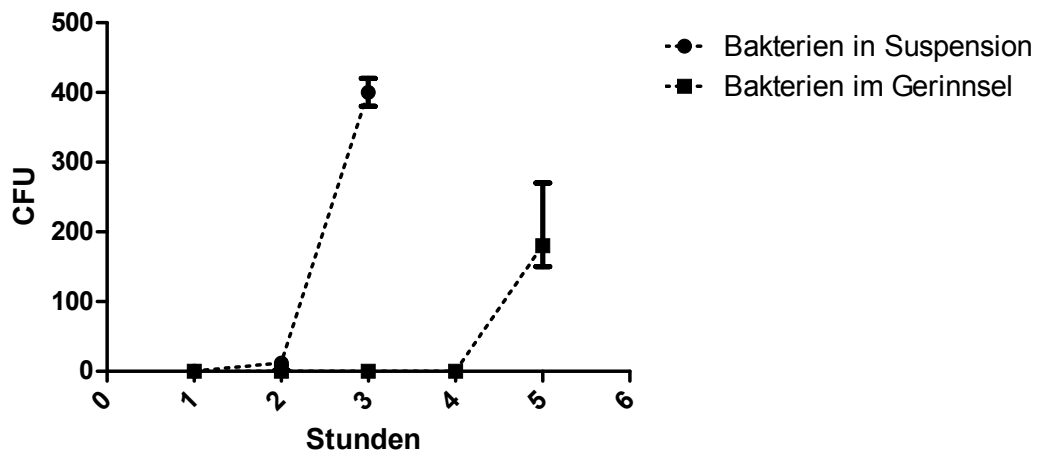


Abbildung 29: Zeitlicher Verlauf der Transmigration der Bakterien durch die Filterporen

Zur Kontrolle wurden Bakterien in Suspension mit PBS in die Transmigrationskammer pipettiert. Nach einer Stunde konnten noch keine Bakterien im Medium detektiert werden. Nach zwei Stunden erreichten die ersten Bakterien das Medium. Nach drei Stunden konnten bereits 400 CFU/200 μ l ausplattiert werden. Im Vergleich dazu, konnten die ersten Bakterien aus dem Gerinnsel erst nach einer Inkubationszeit von fünf Stunden im Medium detektiert werden. $n = 3$

2.2. Thrombozyten verändern durch ihre Kontraktilität die Morphologie der Gerinnsel

Während der Inkubationszeit veränderte sich die Morphologie der Fibrinnetzwerke in den Kammern charakteristisch. Gerinnsel ohne Thrombozyten und mit Myosin IIa-gehemmten Thrombozyten füllten die gesamte Transmigrationskammer aus. Wildtyp-Gerinnsel zeigten sanduhrenförmige Einziehungen (siehe Abbildung 30), die durch die Retraktionsarbeit der Thrombozyten entstanden.

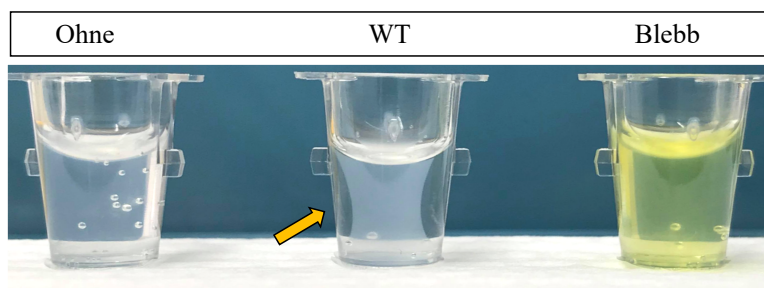


Abbildung 30: Fotografien der Gerinnsel in der Transmigrationskammer nach Inkubation

Während die Gerinnsel ohne Thrombozyten und mit Myosin IIa-inhibierten Thrombozyten die Kammern ausfüllten, zeigten die Wildtyp-Gerinnsel sanduhrenförmige Einziehungen (gelber Pfeil). Diese entstanden durch die Fibrin-Retraktion der Thrombozyten.

2.3. Die Bakterien-Transmigration wird durch die bakterizide Wirkung der Thrombozyten beeinträchtigt

Beim Gerinnsel ohne Thrombozyten konnten nach fünf Stunden durchschnittlich 387 CFU/200 μ l im glukosehaltigen Medium detektiert werden. Das entsprach 79,3 % mehr als beim Wildtypgerinnsel und 85,8 % bzw. 88,9 % mehr als bei den Gerinnseln mit Myosin IIa-gehemmten bzw. MyH9-defizienten Thrombozyten. Der Einfluss von Thrombozyten im Gerinnsel ist daher sehr stark (*Cohen's d* = 1,71 bzw. 1,85 bzw. 2,04). Auch die statistische Analyse ergab ein signifikantes Ergebnis zwischen den Gerinnseln ohne Thrombozyten und den Gerinnseln mit Wildtyp- ($p = 0,018$), para-Nitroblebbistatin-behandelten ($p = 0,002$) bzw. MyH9-defizienten Thrombozyten ($p = 0,002$). Durchschnittlich wurden im Wildtyp-Gerinnsel 80 CFU/200 μ l Medium ausgestrichen. Beim Blebbistatin-Gerinnsel waren es im Mittel 55 CFU/200 μ l und beim MyH9-Gerinnsel 43 CFU/200 μ l (siehe Abbildung 31). Weder die Inhibition (*Cohen's d* = 0,04) noch der genetische Knockout (*Cohen's d* = 0,58) der Retraktionskräfte von Thrombozyten zeigten einen Effekt bezüglich der Transmigration der Bakterien gegenüber dem Wildtyp. Zwischen den drei Gruppen zeigte sich keine signifikante Differenz ($p = 1,0$). Diese Ergebnisse bedeuten, dass Thrombozyten zwar die Transmigration der Bakterien stark beeinträchtigen, ihre Kontraktilität jedoch nicht der zugrundeliegende Mechanismus dafür ist.

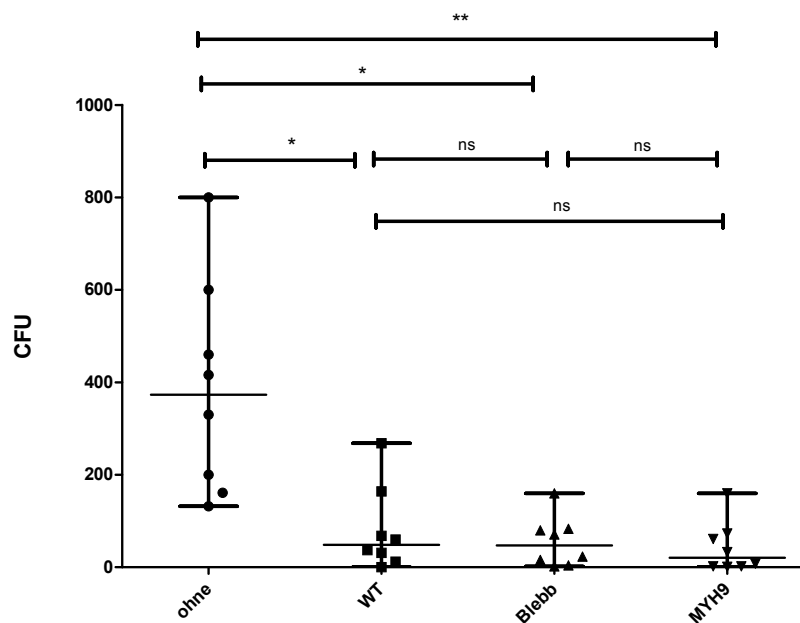


Abbildung 31: Anzahl der im Medium ausplattierten Bakterienkolonien

Im Gerinnsel ohne Thrombozyten gelangten effektiv mehr Bakterien in das Medium, als in den Gerinnseln mit Thrombozyten. Die Hemmung der Kontraktilität der Thrombozyten zeigte keinen Effekt im Vergleich zum Wildtyp.

Kruskal-Wallis-Test mit Adjustierung nach Bonferroni, Median mit Spannweite, $n = 8$

Als Nächstes wurden mögliche Mechanismen untersucht, mit denen der Einfluss der Thrombozyten im Transmigrationsassay erklärt werden konnte. Einerseits könnten durch die PMPs der Thrombozyten Bakterien direkt abgetötet werden, andererseits könnte die Strukturierung des Fibrinnetzwerkes die Durchwanderung der Bakterien beeinflussen. Deshalb wurden für eine Gruppe lediglich die Sekrete aktivierter Thrombozyten für die Gerinnsel verwendet. Für eine weitere Gruppe wurden die Gerinnsel mit Faktor XIII versetzt. Faktor XIII bewirkt eine Quervernetzung der Fibrinfasern und verdichtet somit das Fibrinnetzwerk. Sowohl bei den Gerinnseln ohne Sekrete als auch bei den Gerinnseln mit Faktor XIII wurden im Schnitt 179 CFU/200 μ l ausgezählt. Die Auswertung zeigte weder einen Effekt (*Cohen's d* = 0,01) durch die Zugabe von Faktor XIII noch eine statistisch signifikante ($p = 1,0$) Differenz zwischen den beiden Gruppen. Jedoch konnten in diesen Gerinnseln 77,1 % mehr Bakterien im Medium detektiert werden als bei den Gerinnseln mit den Sekreten der Thrombozyten. Dort gelangten durchschnittlich 41 Bakterien ins S.O.C. Medium (siehe Abbildung 32). Die Analysen verdeutlichen den starken Effekt (*Cohen's d* = 1,66 bzw. 1,89), den die Sekrete auf die Transmigration der Bakterien ausüben. Die Differenz zeigt eine statistische Signifikanz ($p = 0,021$ bzw. 0,026).

Aus diesen Ergebnissen kann geschlussfolgert werden, dass die reduzierte Anzahl an CFUs im Medium auf die bakteriziden Stoffe der Thrombozyten zurückzuführen ist. Nicht durch Immobilisierung, sondern durch direktes Abtöten beeinträchtigen die Thrombozyten somit die Transmigration der Bakterien.

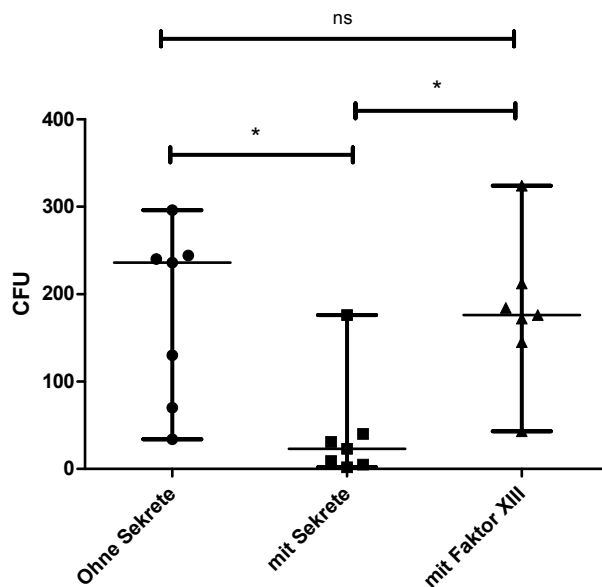


Abbildung 32: Anzahl der im Medium ausplattierten Bakterienkolonien

In den Gerinnseln ohne Sekrete bzw. den Gerinnseln mit Faktor XIII wurden durchschnittlich 179 CFU/200 µl Medium auf den Agarplatten ausgezählt. Das waren rund 77,1 % mehr als in den Gerinnseln mit den Sekreten von Thrombozyten. Während die Zugabe von Faktor XIII keinen Effekt (*Cohen's d* = 0,01) hatte, konnten bei den Gerinnseln mit Sekreten signifikant ($p = 0,021$ bzw. $p = 0,026$) weniger Bakterien im glukosehaltigen Medium detektiert werden.

Kruskal-Wallis-Test mit Adjustierung nach Bonferroni, Median mit Spannweite, $n = 7$

3. Endokarditis Model

Die *in vitro* beobachteten Interaktionen zwischen Thrombozyten, Bakterien und Fibrin, finden sich *in vivo* pathophysiologisch unter anderem an Biofilmen, z.B. bei einer bakteriellen Endokarditis. Um diese Erkrankung an der Aortenklappe hervorzurufen, wurde Mäusen der Wildtyp-Linie C57BL/6J und Mäusen der Linie Pf4-Cre x MyH9^{fl/fl} ein mechanischer Schaden an der Aortenklappe gesetzt. Anschließend wurden die Tiere mit 2×10^7 CFU des *S. aureus* über die Schwanzvene infiziert. Auf diese Weise wurde die Bildung eines Biofilms induziert. Schließlich wurden die Herzklappen entnommen und immunhistologisch gefärbt. Im Anschluss wurden fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen der Biofilme angefertigt.

3.1. Ultraschallkontrolle

Wie bereits erwähnt (siehe IV.8.2.2), wurde bei bisher publizierten Endokarditis-Modellen an der Maus der Katheter zum Verletzen des Klappenendothels blind durch die *A. carotis communis* an die Aortenklappe vorgeschoben. Um die Lage des Katheters zuverlässig und visuell überprüfen zu können, wurde eine Echokardiografiekontrolle des Endokarditis-Modells an der Maus etabliert. Besonders in Hinblick auf das Prinzip der drei R (Replacement, Reduktion, Refinement) [194] war es wichtig, das verwendete Tiermodell zu optimieren und den Endothelschaden kontrolliert zu setzen, um die Zahl der verwendeten Tiere auf ein Minimum begrenzen zu können.

Die Ultraschallkontrolle erfolgte transthorakal, parasternal, auf Höhe des rechten Rippenbogens der auf dem Rücken liegenden Maus. Das Ultraschallbild wurde so eingestellt, dass die *A. carotis communis*, die *Aorta ascendens* und die Aortenklappe sichtbar waren. Unter Ultraschallkontrolle wurde anschließend der Faden durch die *A. carotis communis* sowie über den Aortenbogen und die *Aorta ascendens* vorgeschoben bis schließlich die Aortenklappe an den Faden schlug (siehe Abbildung 33).

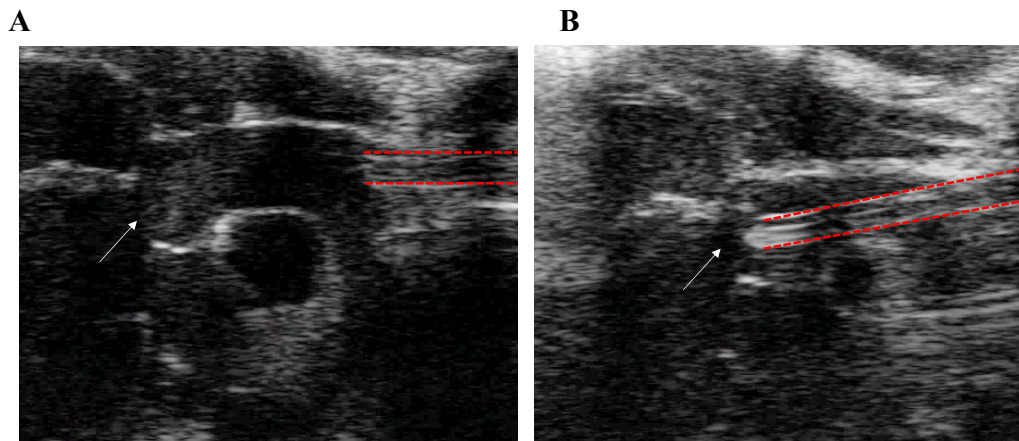


Abbildung 33: Repräsentative Ultraschallaufnahmen während des Vorschiebens des Fadens an die Aortenklappe

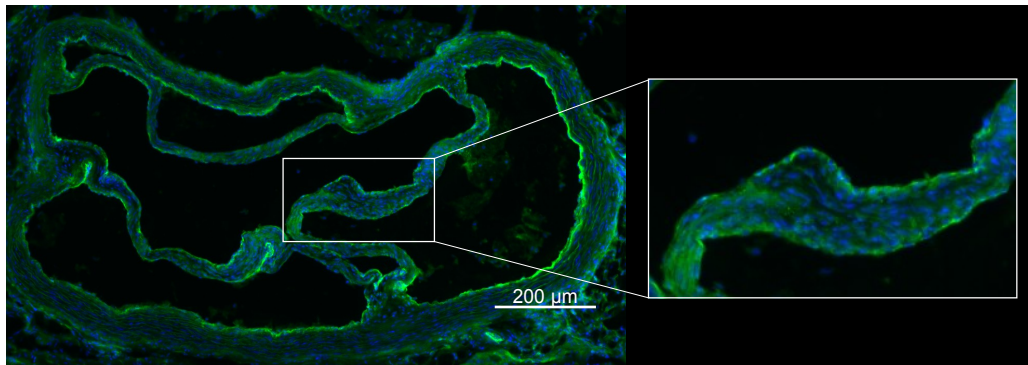
A: Ultraschallaufnahme zu Beginn des Fadeneinführens. Der Faden (rot flankiert) wurde in der *A. carotis communis* sichtbar und befand sich an der Einmündung zur *Aorta ascendens*.

B: Der Faden wurde bis an die Aortenklappe vorgeschoben, die nun bei jedem Öffnen an den Faden schlug.

Ultraschallaufnahme im B-Mode, Pfeil: Aortenklappe, rote Linie: Faden

Es stellte sich heraus, dass das alleinige Pulsieren des sichtbaren Fadenendes kein sicheres Indiz für den korrekten Sitz des Fadens war. In einigen Fällen waren vibrierende Bewegungen des Faden-Endstückes zu erkennen, ohne dass der Faden die Aortenklappe berührte, wie in der Ultraschallkontrolle zu sehen war. Diese Bewegungen waren auf die Pulsation des linken Ventrikels oder das Anstehen des Fadens an die Gefäßwand der Aorta zurückzuführen. Zudem spielte die individuelle Anatomie der Aortenbögen eine große Rolle in Bezug auf das Gelingen der Operation. Handelte es sich um eine sehr stark gebogene *Aorta* oder befindet sich die Einmündung der *A. carotis communis* in die *Aorta ascendens* in einem steilen Winkel, war es äußerst schwierig, die Aortenklappe mit dem Faden zu erreichen. Dann war es entweder notwendig, den Faden wieder herauszuziehen und ihn vor dem erneuten Einbringen leicht zu biegen oder das herausstehende Ende des Fadens geringfügig anzuheben, um ihn in die korrekte Position zu bringen. Die Kontrolle durch das Ultraschallgerät erwies sich dabei als unabdingbar. Durch die immunhistologische Färbung der Aortenklappen mit CD 31, einem Marker für Endothelzellen, konnte die garantierte Verletzung des Klappenendothels durch den Faden bestätigt werden (siehe Abbildung 34).

A



B

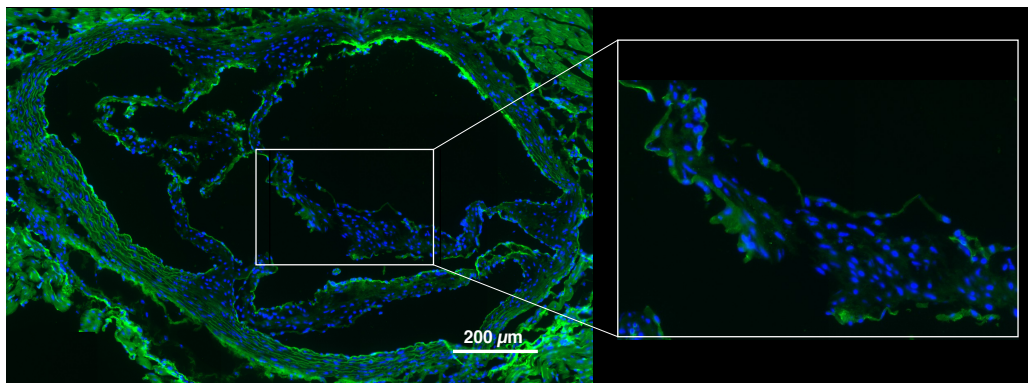


Abbildung 34: Repräsentative Aufnahmen einer unverletzten (A) und verletzten (B) Aortenklappe mit CD31 Färbung

A Intakte Endothelzellen an einer unverletzten Aortenklappe.

B Durch den Faden wurde das Endothel der Aortenklappe massiv beschädigt.

Aufnahme mit einem Epifluoreszenzmikroskop, 400x-Vergrößerung, Mosaik aus Einzelbildern (0,256 cm x 0,256 cm) und Vergrößerung, Grün = CD31 (AF 488), Blau = Zellkernfärbung mit HOECHST 33342

3.2. Biofilmbildung an C57BL/6J-Mäusen

Zunächst wurde im Endokarditis Modell der *S. aureus* Stamm „Newman“ in einer Dosis von 2×10^7 CFU zur Infektion der Mäuse verwendet. Newman ist ein Methicillin-sensitiver *S. aureus* Stamm, der aus einer humanen Infektion isoliert wurde. Er zeigt stark virulente Eigenschaften im Rahmen von Tierversuchsmodellen [195]. Nach der immunhistologischen Analyse der Herzklappen konnten bei 7 von 9 (77,8 %) Tieren septische Vegetationen in Form von vereinzelt Thrombozyten, Bakterien und Fibrin detektiert werden. Nur ein Tier (11,1 %) bildete einen Biofilm an der Aortenklappe aus. Ein Biofilm wurde in dieser Arbeit als eine Masse aus Thrombozyten, Bakterien und Fibrin definiert,

der an das Endothel der Aortenklappe angelagert war und dessen Durchmesser mindestens 100 µm beträgt (siehe Abbildung 35).

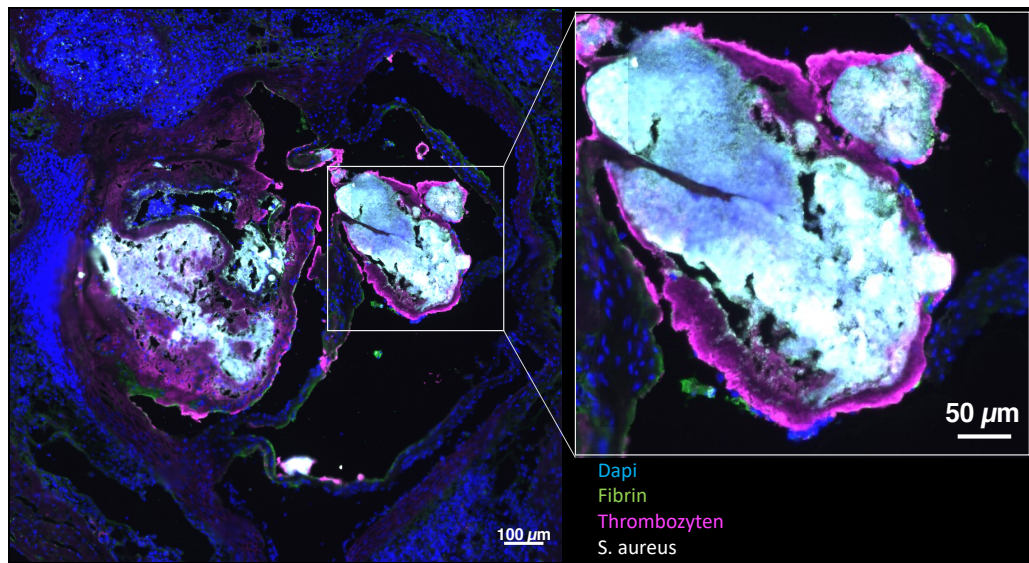


Abbildung 35: Repräsentative Aufnahme eines Biofilms an der Aortenklappe einer C57BL/6J-Maus

Abgebildet ist ein Querschnitt der Aorta auf Höhe der Aortenklappe. Thrombozyten lagerten sich zusammen mit Fibrin und *S. aureus* am Endothel der Aortenklappe an. Die Thrombozyten umrahmten die Bakterien, die sich unter diesem Mantel vermehrten. Da die Größe der beiden Anlagerungen mehr als 100 µm betrug, wurden sie als Biofilm eingestuft.

Aufnahme mit einem Epifluoreszenzmikroskop, 400x-Vergrößerung, Mosaik aus Einzelbildern (0,256 cm x 0,256 cm) und Vergrößerung. Zum besseren Verständnis wurden die Kanäle einzeln und überlagert dargestellt. Magenta = Thrombozyten (AF 488), Grün = Fibrin (AF 594), Weiß = *S. aureus* (AF 647), Blau = Zellkernfärbung mit HOECHST 33342

Da die Erfolgsquote der Ausbildung eines Biofilms mit dem MSSA sehr gering war, wurde als Nächstes der MRSA „USA 300“, ebenfalls in der Dosis 2×10^7 CFU zur Infektion der Mäuse verwendet. Der *S. aureus* Stamm USA 300 ist ein besonders in Westeuropa und den USA verbreiteter MRSA, der hochpathogen und für eine Vielzahl von Haut- und Weichteilinfektionen verantwortlich ist [196]. An den Aortenklappen der Mäuse konnten bei 8 von 18 (44,4 %) Tieren Auflagerungen von Thrombozyten, Bakterien und Fibrin detektiert werden. Insgesamt bildete sich nur bei 6 (33,3 %) der Mäuse ein Biofilm aus.

Um das Auftreten einer Biofilmformation zu erhöhen und somit die Versuchszahl der Mäuse zu reduzieren, wurde als Nächstes ein klinischer MRSA Stamm verwendet. Dieser Stamm zeigte in früheren Publikationen [189] nach dem Setzen

eines Endothelschadens an der Aortenklappe und der intravenösen Injektion von 2×10^7 CFU eine Biofilm-Quote von 80 %. In dieser Arbeit bildeten 3 von 6 Mäusen (50 %) einen Biofilm an der Aortenklappe aus (siehe Abbildung 36). Dies entsprach einer Steigerung der Ausbildung eines Biofilms um 33,4 % im Vergleich zum USA 300. Die Analysen durch den Chi-Quadrat-Test zeigten keine signifikante Differenz zwischen den Gruppen hinsichtlich des Auftretens eines Biofilms (Newman – USA 300: $p = 0,643$; Newman - klinischer MRSA: $p = 0,286$; USA 300 - klinischer MRSA: $p = 1,0$).

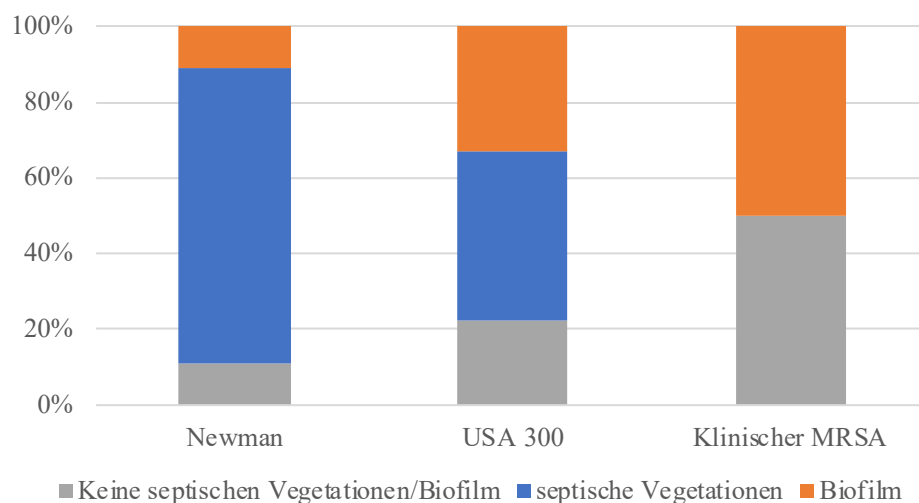


Abbildung 36: Anlagerungen und Biofilmformationen beim Wildtyp nach Infektion mit verschiedenen *S. aureus*-Stämmen

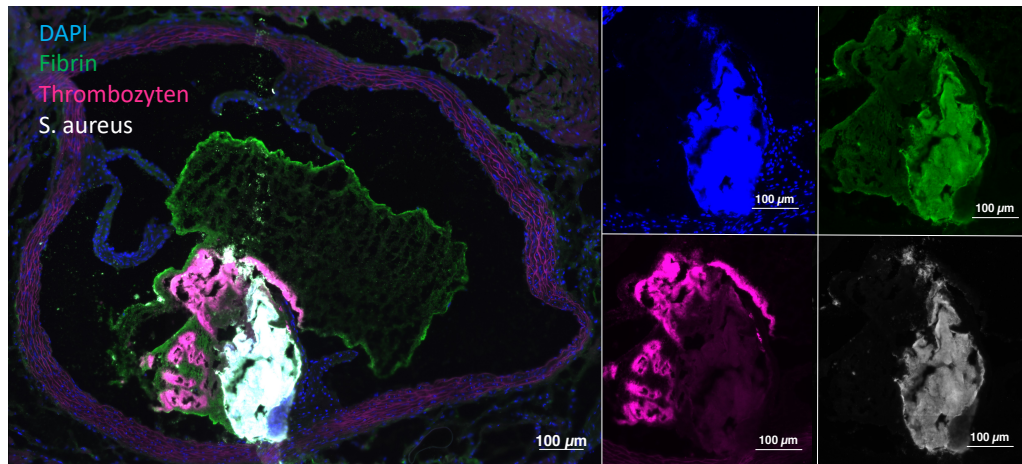
Wurden die Mäuse mit dem *S. aureus*-Stamm Newman infiziert, bildete sich bei 11,1 % ein Biofilm an der Aortenklappe aus. Die Infektion mit dem USA 300 steigerte das Auftreten eines Biofilms auf 33,3 %. Nach Infektion mit dem klinischen MRSA entwickelten 50 % der Mäuse einen Biofilm. Es konnte keine statistische Differenz zwischen den Gruppen bewiesen werden (Newman-USA300: $p = 0,643$; Newman-klinischer MRSA: $p = 0,286$; USA300-klinischer MRSA: $p = 1,0$).

3.3. Biofilmformation an Pf4-Cre x MyH9^{flx/flx}- Mäusen

Die Durchführung des Endokarditis-Modells gestaltete sich bei den Pf4-Cre x MyH9^{fl/fl}-Mäusen erschwert. Die erhöhte Blutungsneigung der Pf4-Cre⁺ x MyH9^{fl/fl}-Tiere forcierte die Belastung des Kreislaufs durch die als sehr invasiv anzusehende Operation. Bereits vor der Infektion mit dem klinischen *S. aureus* Stamm mussten 3 der 9 (33,3 %) Pf4-Cre⁺ x MyH9^{fl/fl}-Mäuse erlöst werden. Auch die Pf4-Cre⁻ x MyH9^{fl/fl}-Tiere dieser Linie tolerierten die Operation sehr schlecht. Da die Tiere engmaschig überwacht und durch ein Score-Sheet der Allgemeinzustand (siehe IV.8.1) beurteilt wurde, mussten nach der Infektion mit

der Zeit alle Tiere frühzeitig erlöst werden. Nach dem Tod wurden die Herzen der Tiere entnommen und immunhistologisch gefärbt (siehe Abbildung 37).

A



B

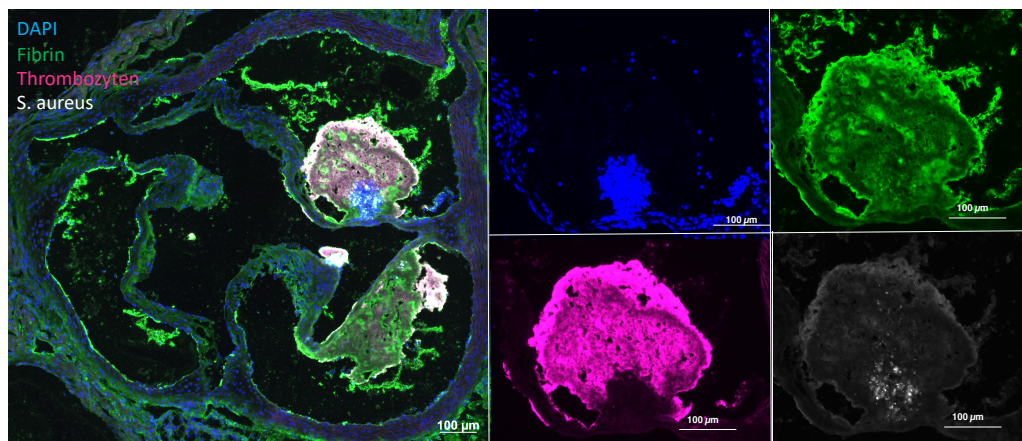


Abbildung 37: Repräsentative Aufnahme des Biofilms an der Aortenklappe von Pf4cre x MyH9^{flox/flox}-Mäusen

A Biofilm an der Aortenklappe einer Pf4-Cre⁻ x MyH9^{fl/fl} Maus (Wildtyp)

B Biofilm an der Aortenklappe einer Pf4-Cre⁺ x MyH9^{fl/fl} Maus (Knockout)

Aufnahme mit einem Epifluoreszenzmikroskop, 400x-Vergrößerung, Mosaik aus Einzelbildern (0,256 cm x 0,256 cm) und Vergrößerungen. Zum besseren Verständnis wurden die Kanäle einzeln und überlagert dargestellt, Grün = Fibrin (AF 594), Magenta = Thrombozyten (AF 488), Weiß = *S. aureus* (AF 647), Blau = Zellkernfärbung mit HOECHST 33342

Die immunhistologische Färbung zeigte bei 3 von 7 (42,9 %) der Pf4-Cre⁻ x MyH9^{fl/fl}-Mäusen und bei 4 von 6 (66,7 %) der Pf4-Cre⁺ x MyH9^{fl/fl}-Mäusen Auflagerungen an den Aortenklappen, die aus Thrombozyten, Bakterien und Fibrin bestanden (septische Vegetationen). Zwei septische Vegetationen waren bei den Cre-negativen Mäusen von der Größe so

beschaffen, dass sie in die Kategorie der Biofilme eingestuft wurden (28,6 %). Bei den Cre-positiven Tieren wurde eine Struktur als Biofilm (16,7 %) klassifiziert (siehe Abbildung 38). Durch Analyse anhand des Fisher's-exact-Tests konnte kein signifikanter Unterschied ($p = 1,0$) zwischen den beiden Gruppen bezüglich der Ausbildung eines Biofilms festgestellt werden.

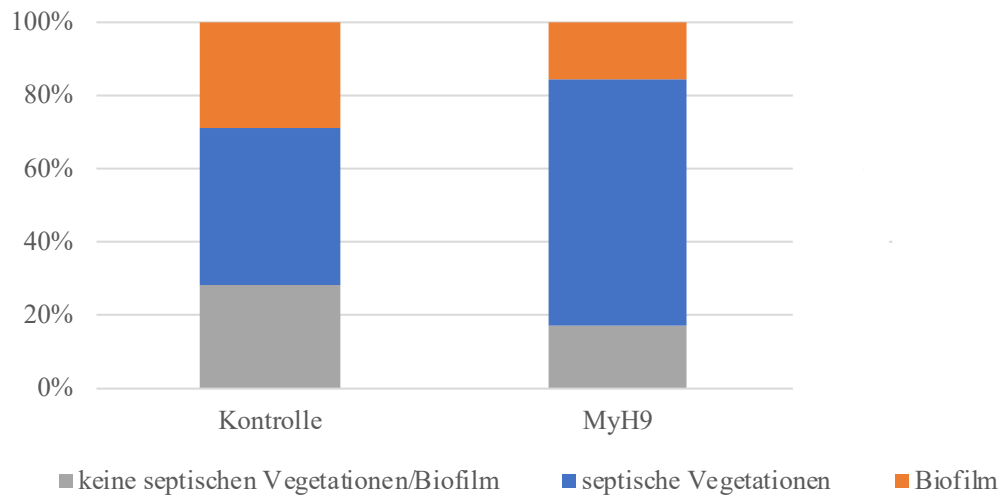


Abbildung 38: Anlagerungen und Biofilmformationen bei der Linie Pf4cre x MyH9^{n/n} nach Infektion mit dem klinischen *S. aureus* Stamm

Nach Operation und Infektion, bildeten bei den Cre-negativen Tieren 42,9 % der Mäuse septische Vegetationen an den Aortenklappen aus, wobei bei 28,6 % der Tiere ein Biofilm detektiert wurde. Bei den Cre-positiven Mäusen kam es bei 66,7 % zu Vegetationen an den Klappen und 16,7 % der Tiere entwickelte einen Biofilm. Es konnte keine statistische Signifikanz bewiesen werden ($p = 1,0$).

Ein Merkmal, durch welches das Ausmaß eines Biofilms bestimmt werden kann, ist die Quantifizierung der Masse an Bakterien. Darüber lassen sich Aussagen treffen, wie effizient sich die Bakterienkolonien am verletzten Endothel anlagern und wie stark sie sich vermehren konnten. Vergleicht man in diesem Zusammenhang die durchschnittliche Bakterienfläche zwischen Wildtyp und Knockout, könnte man daraus Rückschlüsse ziehen, inwieweit die Kontraktilität der Thrombozyten diese Prozesse beeinflusst. Dazu wurden anhand der Imaris Software und der Funktion „Surface“ die gesamte Fläche der Bakterien in den gefärbten Herzklappen ausgewertet.

Durchschnittlich betrug die Fläche der Bakterien beim Wildtyp $9590,7 \mu\text{m}^2$ und war damit um 44,3 % größer als beim Knockout mit im Schnitt $5341,6 \mu\text{m}^2$ (siehe Abbildung 39). Trotz des mittelgradigen Effekts (*Cohen's d* = 0,44) war diese

Tendenz jedoch bei der geringen Gruppengröße und der enormen Varianz statistisch nicht signifikant ($p = 0,691$).

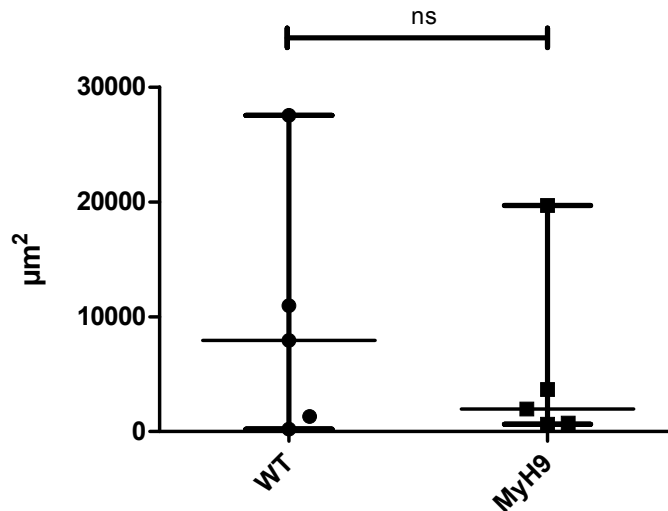


Abbildung 39: Fläche an Bakterien in den Herzklappenschnitten

Im Schnitt war die Bakterienfläche der Herzklappenschnitte beim Wildtyp um 44,3 % größer als beim Knockout. Durch die geringe Gruppengröße und die enorme Varianz der Ergebnisse, war diese Tendenz jedoch nicht signifikant ($p = 0,691$).

Mann-Whitney-U-Test, Median mit Spannweite, $n = 5$

Als Nächstes wurde für jeden histologischen Schnitt der Aortenklappen die gesamte Fläche der Thrombozyten ins Verhältnis zur gesamten Fläche der Bakterien gesetzt. Dieses Verhältnis könnten einen Hinweis darauf geben, ob die Kontraktionsfähigkeit der Thrombozyten bei der Anlagerung und der Proliferation von Bakterien eine Rolle spielt. Durchschnittlich betrugen die Verhältnisse der Fläche der angelagerten Thrombozyten zur Fläche der Bakterien beim Cre-negativen Tier 5,2 und beim Cre-positiven Tier 12,1. Betrachtet man die Verteilung der Werte in Abbildung 40, ist zu erkennen, dass dieser starke Effekt (*Cohen's d* = 0,81) auf nur ein Knockout-Tier mit einem sehr hohen Verhältnis von Thrombozyten zu Bakterien zurückzuführen ist. Die übrigen Werte lagen beim Knockout in der gleichen Größenordnung wie beim Wildtyp. Dementsprechend waren die Unterschiede in der Auswertung statistisch nicht signifikant ($p = 0,222$).

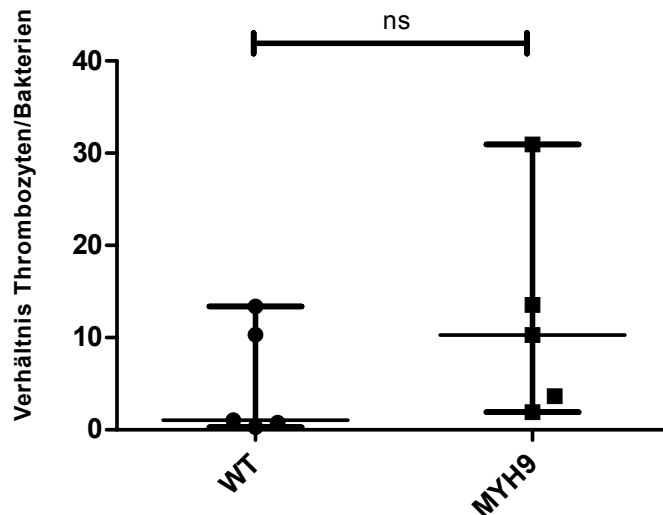


Abbildung 40: Verhältnis der Thrombozyten zu den Bakterien an den Vegetationen

Die Vegetationen an den Aortenklappen wurden in Bezug auf das Verhältnis der Fläche an Thrombozyten zur Bakterienfläche ausgewertet. Durchschnittlich betrug dieses Verhältnis bei der Pf4-Cre x MyH9-negativen Maus 5,2, während es bei der Cre-positiven Maus 12,1 betrug. Die statistische Auswertung zeigte keinen signifikanten Unterschied zwischen den beiden Gruppen.

Mann-Whitney-U-Test, Median mit Spannweite, n = 5

Bei Betrachtung der Herzschnitte wurde der Eindruck gewonnen, dass sich beim Cre-negativen Tier, die Signale für Thrombozyten und Bakterien häufiger überschneiden, als beim Cre-positiven Tier (siehe Abbildung 41). Aus diesem Grund wurde der Anteil der Thrombozytenfläche analysiert, der sich mit der Bakterienfläche deckte. Für die Auswertung wurde wiederum die Imaris Software herangezogen. Mit der Funktion „Colocalization“ konnte die Fläche der Thrombozyten ermittelt werden, die sich mit den Fluoreszenzsignalen der Bakterien überschneidet. Diese wurde anschließend in das Verhältnis zur gesamten Thrombozytenfläche gesetzt.

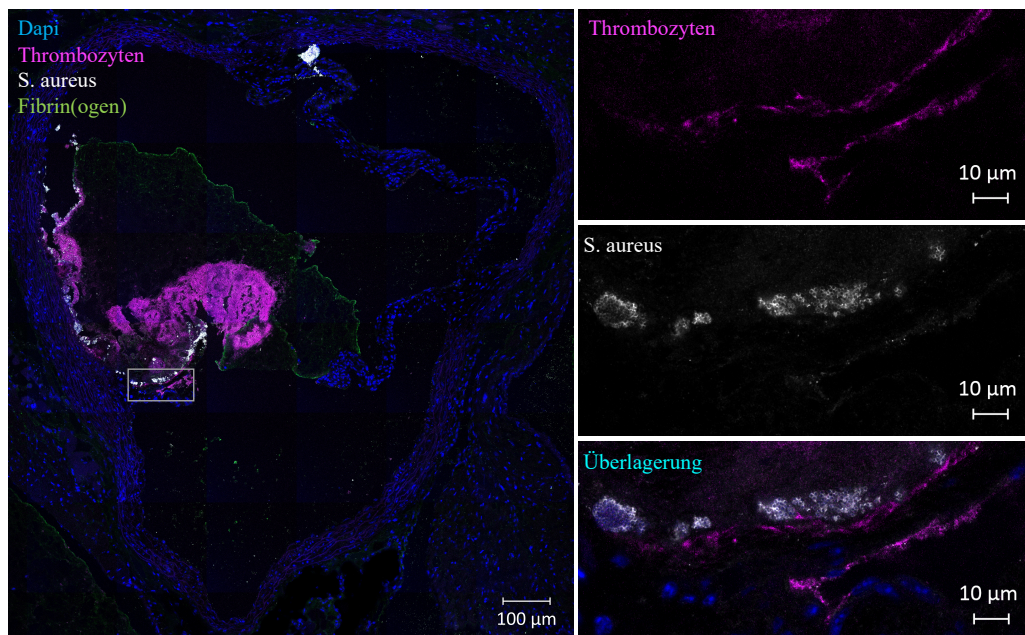
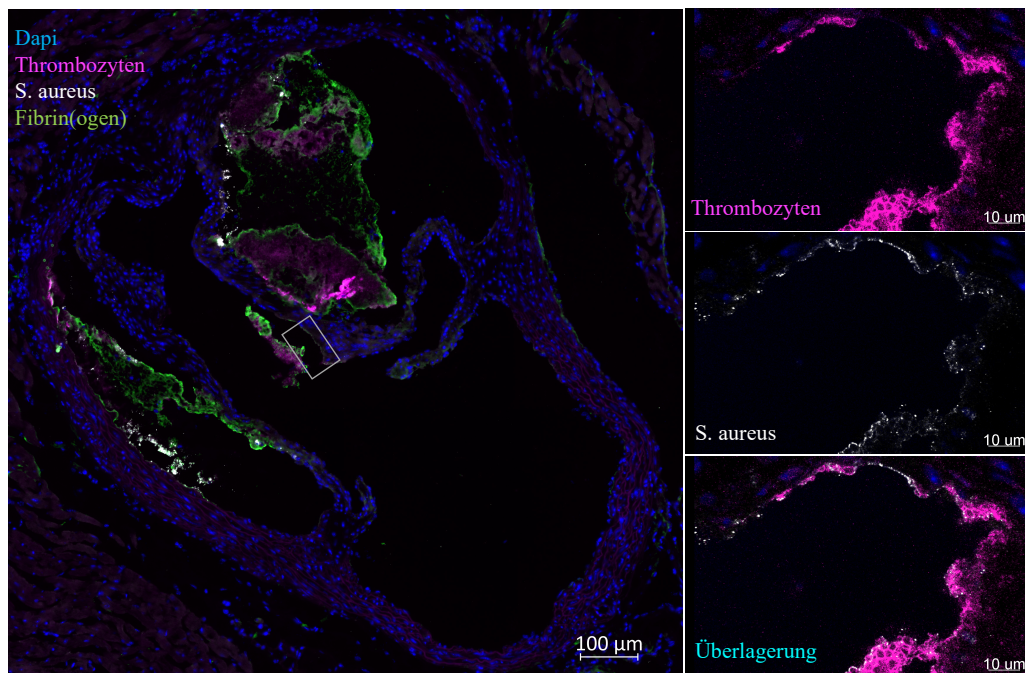
A**B**

Abbildung 41: Repräsentative Aufnahmen von Bereichen mit Thrombozyten und *S. aureus*

A: Beim Wildtyp wurde der visuelle Eindruck gewonnen, dass Bakterien häufig an Thrombozyten angrenzten.

B: Überlagerungen von Thrombozyten und Bakterien wurden beim Knockout seltener beobachtet.

Vergrößerung einer Aufnahme mit einem konfokalen Mikroskop, 400x- bzw. 630x-Vergrößerung. Zum besseren Verständnis wurden die Kanäle einzeln und überlagert dargestellt, Grün = Fibrin (AF 594), Magenta = Thrombozyten (AF 488), Weiß = *S. aureus* (AF 647), Blau = Zellkernfärbung mit HOECHST 33342

Bei den Aortenklappen der Cre-negativen Tiere befanden sich durchschnittlich 8,2 % der Thrombozyten in Kolokalisation mit Bakterien. Beim Knockout waren es im Mittel 2,1 %. Bei Betrachtung der Werteverteilung in Abbildung 42 fiel auf, dass auch hier der mittelgradige Effekt (*Cohen's d* = 0,68) nur durch den Wert eines einzigen Kontrolltieres zustande kam. Die übrigen Werte beider Gruppen lagen eng zusammen. Die Tendenzen erreichten in der statistischen Auswertung somit keine Signifikanz ($p = 0,310$).

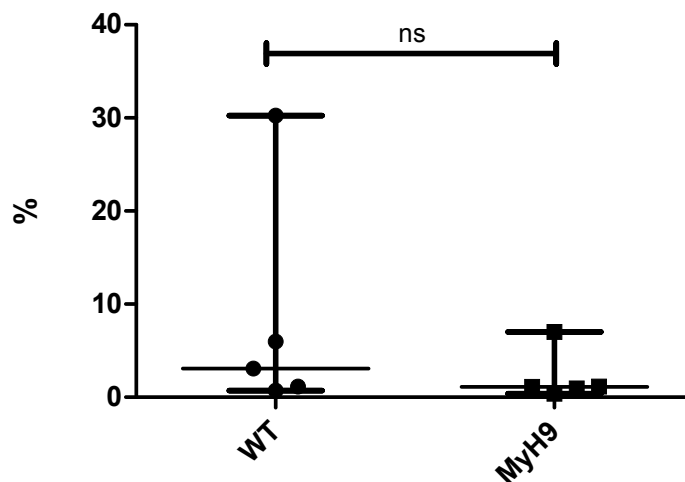


Abbildung 42: Anteil der Thrombozytenfläche in Kolokalisation mit Bakterien

Da durch die Betrachtung der Herzschnitte der Eindruck gewonnen wurde, dass sich die Signale für Thrombozyten und Bakterien beim Wildtyp häufiger überschneiden, als beim Knockout, wurde der Anteil der Thrombozytenfläche analysiert, der sich mit der Bakterienfläche überschneidet. Das Ergebnis zeigte eine Tendenz, die diesen Eindruck bestätigte, jedoch keine statistische Signifikanz ($p = 0,310$).

Mann-Whitney-U-Test, Median mit Spannweite, $n = 5$

VI. DISKUSSION

Zur Erforschung der Rolle kontraktile Kräfte von Thrombozyten in der Biofilmbildung wurde in dieser Arbeit das Versuchstier Maus ausgewählt. Vorteile schließen die kleine Körpergröße, die ökonomische Unterbringung und die kurzen Reproduktionszyklen ein. Wesentlich ist außerdem ihre Ähnlichkeit zum humanen kardiovaskulären System [197-199] und die Verfügbarkeit diverser Knockout-Stämme, um die Immunfaktoren im Rahmen einer Infektion zu erforschen. Einige Autoren bemängeln, dass besonders die Virulenzfaktoren des *S. aureus* hohe Spezifität gegenüber humanen Zellen aufweisen und stellen daher die Validität von Maus-Modellen zu humanen Infektionskrankheiten infrage [200-202]. Dem entgegen wurde gezeigt, dass sich murine und humane Biofilme in ihrer Struktur ähneln und dass auch ältere Mäuse –vergleichbar zu Senioren– nach Infektion mit *S. aureus* spontan eine infektiöse Endokarditis entwickeln können [189]. Gärtner *et al.* konnte *in vitro* die Fähigkeit der Thrombozyten, Bakterien zu bündeln, sowohl für murine als auch für humane Thrombozyten demonstrieren. Sie konnten aufzeigen, dass dafür die gleichen zellulären Mechanismen genutzt werden [9]. Insgesamt kann gesagt werden, dass die Maus als Versuchstier hinsichtlich der Übertragbarkeit auf den Menschen zwar einigen Einschränkungen unterliegt, sich jedoch aufgrund der genannten Aspekte sehr gut für die kardiale Grundlagenforschung eignet.

Neben Wildtypmieren der Linie C57BL/6J wurden in dieser Arbeit Mäuse der Linie Pf4-Cre x MyH9^{flox/flox} verwendet. Diese Linie ist sehr gut charakterisiert und weist einen sehr spezifischen Knockout des Myosin IIa in den Megakaryozyten auf [167]. Dadurch sind Thrombozyten dieses Stammes nicht fähig, sich zu kontrahieren, was zur Folge hat, dass sie weder migrieren [9] noch ein Gerinnsel retrahieren können [71]. Ein Vergleich MyH9-defizienter und intakter Thrombozyten gibt Einblick in die physiologischen Funktionen der Thrombozyten und entschlüsselt zelluläre Mechanismen, die bei der Interaktion der Thrombozyten mit Fibrin und *S. aureus* eine Rolle spielen.

Der erste Teil dieser Arbeit erfolgte durch *in vitro*-Experimente. Dieser beschäftigte sich mit dem Vergleich Myosin IIa-gehemmter Thrombozyten mit Wildtyp-Thrombozyten und ihren Interaktionen mit *S. aureus* und Fibrin in einem

dreidimensionalen Fibrinnetzwerk. Das Koagulationssystem dient nicht nur als Schutzmechanismus bei Blutungen, sondern ist Teil der körpereigenen Abwehr gegen eindringende Mikroorganismen (siehe II.3.). Zum einen können Thrombozyten Pathogene anhand von Rezeptoren oder über das Brückenmolekül Fibrin(ogen) direkt an sich binden [83]. Zum anderen können sie durch die Induktion der Gerinnung Bakterien in einem Netzwerk aus Fibrin einfangen, der sogenannten Immunothrombose [2]. Durch diese Mechanismen stellen sie eine Barriere dar, Infektionen lokal zu kontrollieren und die Dissemination der Bakterien im Organismus zu verhindern. Gärtner *et al.* konnten bereits zeigen, dass Thrombozyten *in vitro* auf einer mit Fibrin beschichteten Oberfläche im Rahmen ihrer Migration Bakterien sammeln und bündeln. Sie nutzen dazu Fibrin als Matrix, um mit ihrer Umgebung in Kontakt zu treten und akkumulieren die Bakterien zusammen mit dem Fibrin auf ihrer Oberfläche. *In vivo* unterstützen die Thrombozyten in den Kapillaren der Leber durch das Bündeln von Bakterien die Immunantwort [9]. Basierend auf diesen Ergebnissen stellte sich die Frage, ob diese Fibrin-vermittelte Bildung von Thrombozyten-Bakterien-Aggregaten auch in einem dreidimensionalen Netzwerk beobachtet werden kann, wie beispielsweise einem Gerinnsel. Derartige Gerinnsel erinnern in ihrer Struktur stark an pathologische Biofilme, wie sie im Rahmen einer Endokarditis auftreten. Einblicke in die Interaktionen zwischen Thrombozyten, Bakterien und Fibrin gewinnen besonders unter diesem Gesichtspunkt stark an Bedeutung. Um die genannten Interaktionen zu erforschen, wurden Gerinnsel aus Fibrin, *S. aureus* und Thrombozyten, die durch ADP, TXA₂, Kalzium und Thrombin aktiviert wurden, in einer μ -Kammer untersucht. Durch fluoreszierende Marker konnten sowohl die Struktur der Gerinnsel als auch die zellulären Bestandteile und deren Zusammenspiel beleuchtet werden.

Bei mikroskopischer Betrachtung der Gerinnsel wurde erkennbar, dass die Thrombozyten das Fibrinnetzwerk charakteristisch strukturierten. Die Thrombozyten komprimierten das Fibrinnetzwerk und lagerten sich zu Thrombozytenaggregaten zusammen, die radiär Fibrinfasern entließen. Die dafür verantwortlichen Mechanismen wurden von verschiedenen Arbeitsgruppen bereits umfangreich untersucht. Durch die Koordination physiochemischer Interaktionen zwischen Aktin, Myosin und dem $\alpha\text{IIb}\beta 3$ -Integrin generieren Thrombozyten kontraktile Kräfte [62, 66], die über das Thrombozyten-Fibrin-Netzwerk

übertragen werden [68, 203]. Untersuchungen von Kim *et al.* zeigen, dass Thrombozyten durch die abwechselnde Extension und Retraktion ihrer Filopodien an den Fibrinfasern ziehen und diese kontrahieren. Durch diesen Mechanismus akkumulieren sie Fibrin auf ihrer Oberfläche und ziehen einander näher [71]. In der Hämostase sorgen Thrombozyten so für die Retraktion des Thrombus und schützen dadurch Blutgefäße vor einer Obstruktion [61]. Im Gegensatz dazu konnten in Gerinnseln, in denen Myosin IIa-gehemmte Thrombozyten verwendet wurden, keine derartigen Thrombozyten-Zentren, sondern ein einheitliches Fibrinnetzwerk beobachtet werden. Durch die Hemmung des Myosins im Zytoskelett, sind diese Thrombozyten nicht in der Lage sich zu kontrahieren [167]. Die Strukturierung des Fibrinnetzwerkes ist somit ein Aktomyosin-abhängiger Prozess, der durch Kontraktionsbewegungen der Thrombozyten zustande kommt.

Als Nächstes wurden die Interaktionen zwischen Thrombozyten und *S. aureus* im Gerinnsel untersucht. Durch fluoreszenzmikroskopische Analysen wurde ersichtlich, dass Thrombozyten auch im 3D-Gerinnsel Bakterien zu Aggregaten bündeln. Bakterienaggregate, die mit Thrombozyten kolokalisierten, waren um ein Vielfaches größer als Bakterienaggregate ohne Kontakt zu Thrombozyten. In Gegenwart des Myosin II Inhibitors para-Nitroblebbistatin befanden sich außerdem signifikant weniger Bakterien in Kolokalisation mit Thrombozyten als im Wildtyp-Gerinnsel. Zudem waren diese Bakterienaggregate signifikant kleiner. Dies lässt darauf schließen, dass das Bündeln der Bakterien im Gerinnsel durch Aktomyosin-abhängige Kräfte enorm gesteigert wird. In dem 2D-Assay der Gruppe um Gärtner sammeln die Thrombozyten die Bakterien, indem sie über die Fibrin-beschichtete Oberfläche wandern [9]. Während der Migration bilden die Thrombozyten Lamellipodien aus, mit dem sie ihren Zellkörper in Richtung der Migration vergrößern. Durch die Untersuchungen von Kim *et al.* wird gezeigt, dass Thrombozyten im Fibrinnetzwerk jedoch Filopodien ausbilden. Aus diesem Grund ist davon auszugehen, dass Thrombozyten Bakterien im Gerinnsel nicht im Rahmen ihrer Migration, sondern durch Kontraktion der Fibrinfasern bündeln [71]. Dafür sprechen außerdem unsere eigenen Beobachtungen, dass Bakterienaggregate, die nicht mit Thrombozyten assoziiert sind, im Wildtyp-Gerinnsel mehr als doppelt so groß sind als im Gerinnsel mit MyH9-defizienten Thrombozyten. Durch die Kontraktion der Fibrinfasern durch Thrombozyten

werden nicht nur Thrombozyten-nahe Bakterien gebündelt und diese auf den Thrombozyten akkumuliert. Auch periphere Bakterien werden durch die Komprimierung der Fibrinfasern einander angenähert und zu kleineren Aggregaten akkumuliert.

Die Bildung von Thrombozyten-Bakterien-Assoziaten spielt für den Organismus eine ambivalente Rolle. Einerseits potenziert es die Rekrutierung und Aktivierung von neutrophilen Granulozyten, die Pathogene phagozytieren und somit unschädlich machen können [9]. Andererseits fungieren zirkulierende Thrombozyten für die Bakterien als eine Art Vektor, wodurch sie die Ausbreitung der Bakterien über das Blut fördern könnten. Zudem führt die vermehrte Bildung von Thrombin an der Oberfläche aktivierter Thrombozyten zu einer gesteigerten Umwandlung von Fibrinogen zu Fibrin [204, 205]. Während das Fibrin ursprünglich für die Stabilität des Thrombus sorgt, schützt es nun die Bakterien vor der Immunantwort und Antibiotika [6, 7, 206]. Fibrin bietet außerdem eine zusätzliche Oberfläche zur Anbindung weiterer Bakterien [207]. Die erhöhte Produktion von Thrombin aktiviert zugleich weitere Thrombozyten [63]. Diese binden wiederum Bakterien und können dadurch den septischen Thrombus vergrößern. Im weiteren Verlauf könnte das zur Bildung eines Biofilms führen. *S. aureus*-Biofilme entlassen häufig kleinere, septische Emboli in die Blutbahn [142, 143]. Diese können entweder zu einer Sepsis führen oder sich an Endothelzellen anlagern und dadurch weitere Organe hämatogen infizieren und kolonisieren [115, 208, 209]. *In vitro* Untersuchungen von Fux *et al.* postulieren, dass größere Emboli von *S. aureus*-Biofilmen eine höhere Toleranz gegenüber Oxacillin zeigen, als Emboli von kleinerem Ausmaß oder solche, die mechanisch zerstört wurden [208]. Die Hemmung des Myosins in Thrombozyten, die die Bildung von kleineren Bakterien-Thrombozyten-Aggregaten in Gerinnseln zur Folge hat, könnte aus diesen Gründen auf eine therapeutische Strategie hinweisen. Sie könnte die Entstehung von Biofilmen eventuell einschränken und im weiteren Verlauf die Empfindlichkeit von Biofilmen gegenüber antimikrobiellen Therapien erhöhen. Ähnliche Effekte könnte die reduzierte Interaktion von Thrombozyten mit Fibrin bewirken. Durch flussbedingten Shear Stress könnte das weniger gefestigte Fibrinnetzwerk [210] schneller abreißen und dadurch ebenfalls kleinere Emboli entlassen. Diese könnten eventuell vom Immunsystem oder durch

frühzeitige Antibiotika-Therapie beseitigt werden, bevor sie andere Organe infizieren und zu einem neuen Biofilm heranwachsen können.

Diese genannten *in vitro* Untersuchungen wurden an einem statischen Model durchgeführt. Physiologisch ist ein Gerinnsel jedoch stets dem Blutfluss ausgesetzt. Um diesen Faktor in den Versuchsaufbau miteinzubeziehen wurde der Versuch wiederholt und im Anschluss an ein Pumpsystem angeschlossen. Dadurch wurde ein gleichmäßiger Fluss durch die Gerinnsel geleitet. Unsere Annahme war, dass die Gerinnsel mit Wildtyp-Thrombozyten, die Bakterien effektiver im Fibrinnetzwerk zurückhalten können als Myosin IIa-gehemmte Thrombozyten. Wildtyp-Thrombozyten komprimieren und festigen das Fibrinnetzwerk mit ihren kontraktile Kräften [71, 210] und binden zudem einen größeren Anteil der Bakterien. Daher lag die Vermutung nahe, dass im Gerinnsel mit Myosin IIa-gehemmten Thrombozyten die Bakterien durch den Fluss leichter ausgespült werden. Die Bedeutung des Fibrins für das Einschließen von Pathogenen wurde von Prasad *et al.* anhand eines Mausmodels mit intraperitonealer *S. aureus*-Infektion gezeigt [211]. Mäuse mit einer mutierten Form von Fibrinogen, das nicht zu Fibrin umgewandelt werden kann, weisen eine beeinträchtigte Immunabwehr und eine verringerte bakterielle Clearance auf. Sun *et al.* bewiesen, dass eine reduzierte Thrombinbildung oder die Eliminierung des Fibrinogens selbst, sowohl die Pathogen-Ausbreitung als auch die Mortalität des Wirtes nach subkutaner Infektion mit Streptokokken steigert [212]. Die Quantifizierung der gesamten Bakterienfläche der Gerinnsel unter statischen Bedingungen und unter Fluss-Bedingungen konnte unsere Erwartungshaltung bestätigen. Während die Gesamtzahl der Bakterienfläche beim Wildtyp nach dem Fluss konstant blieb, fiel sie beim Gerinnsel mit Myosin IIa-gehemmten Thrombozyten um ein Drittel ab. In Anbetracht dieser Ergebnisse scheinen Thrombozyten zur Immunothrombose weitaus mehr beizutragen als bisher gedacht. Hinsichtlich dessen werden den Thrombozyten bislang vor allem die gerinnungsfördernde Wirkung sowie die Rekrutierung weiterer Immunzellen als zentrale Aufgaben zugeschrieben [2]. Unsere Ergebnisse ergänzen ihre Funktionen und zeigen, dass Thrombozyten anhand ihrer kontraktile Kräfte das Fibrinnetzwerk und die darin enthaltenen Bakterien so strukturieren, dass eine Dissemination der Bakterien durch den Blutfluss vermieden wird.

Ein Defizit dieses Versuchsaufbaus ist sicherlich, dass es sich bei den verglichenen Gerinnseln unter statischen bzw. Fluss-Bedingungen nicht um dieselben Gerinnsel handelt. Zwar wurden sie am selben Versuchstag aufgenommen und somit die Thrombozyten derselben Maus verwendet, jedoch ist ein strukturelles Variieren der Fibrinnetzwerke unvermeidbar. Da es sich beim *S. aureus* Stamm „USA300“ um einen Keim der Sicherheitsstufe 2 (S2) handelt, müssen die Bakterien in den Gerinnseln fixiert werden, bevor sie mit dem konfokalen Mikroskop, das sich in unserem Labor im Bereich ohne Sicherheitsstufe befindet, aufgenommen werden können. Die Gerinnsel konnten also aus technischen Gründen nicht erst mikroskopiert und anschließend dem Fluss ausgesetzt werden, weil sie zum Zeitpunkt des Mikroskopierens bereits fixiert sein mussten. Gleichwohl konnte an jedem der Versuchstage die signifikante Diskrepanz in der Bakterienfläche beim Gerinnsel mit inhibierten Thrombozyten zwischen statischen Bedingungen und Fluss-Bedingungen beobachtet werden, während beim Wildtyp die gesamte Bakterienfläche in ihrem Durchschnitt stets übereinstimmte. Durch die hohe Anzahl an Versuchstagen, die stetigen und kongruenten Ergebnisse und den Vergleich durch die Kontrollgruppe, wurde die Methode und die Analogie der Gerinnsel jedoch umfangreich geprüft und validiert.

Interessanterweise änderte sich durch den Fluss weder beim Wildtyp noch beim Gerinnsel mit Myosin IIa-gehemmten Thrombozyten die Größe der Bakterienaggregate sowohl in Kolo-kalisation als auch ohne Kolo-kalisation mit Thrombozyten. Auch der Anteil der mit Thrombozyten-assoziierten Bakterien blieb unter Fluss-Bedingungen beim Wildtyp nahezu identisch. Beim Gerinnsel mit Myosin IIa-gehemmten Thrombozyten stieg der Anteil der mit Thrombozyten-assoziierten Bakterienfläche leicht an. Diese Tendenz war zwar nicht signifikant, könnte aber ein Hinweis dafür sein, dass im Blebbistatin-Gerinnsel Bakterien ohne Thrombozytenkontakt eher durch den Fluss aus dem Fibrinnetzwerk gespült werden als solche, die mit Thrombozyten verbunden sind und dadurch zusätzlich festgehalten werden. Das ist insbesondere interessant, da der Fluss und die damit einhergehenden Kräfte eine Konformationsänderung am vWF der Thrombozyten hervorrufen. Dieser Mechanismus ermöglicht dem *S. aureus* unter Fluss erheblich stärker an die Thrombozyten zu binden als unter statischen Bedingungen [94].

Es ist bekannt, dass Thrombozyten durch ihre bakteriziden Sekrete Pathogene abtöten können [73, 74]. Daher stellte sich die Frage, ob die bakterizide Wirkung der Thrombozyten durch das Bündeln größerer Bakterienaggregate beeinflusst wird. Anhand einer lebend/tot Färbung konnte in den Gerinnseln zwischen vitalen und toten Bakterien differenziert werden. Es wurden Gerinnsel ohne Thrombozyten, Gerinnsel mit Wildtyp-Thrombozyten und Gerinnsel mit Thrombozyten von Mäusen der Linie Pf4cre x MyH9^{flox/flox} verglichen. In diesem Zusammenhang ist wichtig zu erwähnen, dass Mäuse der Linie Pf4-Cre x MyH9^{fl/fl} in ihrer Sekretion unbeeinträchtigt sind [167].

Der Vergleich zwischen den Gerinnseln ohne Thrombozyten und den nativen Bakterien der Übernacht-Kultur zeigte, dass die alleinige Formation eines Fibrinnetzwerkes die Vitalität der Bakterien nicht beeinflusst. Jedoch konnten sowohl im Gerinnsel mit Thrombozyten einer Wildtyp-Maus als auch im Gerinnsel mit MyH9-defizienten Thrombozyten signifikant mehr tote Bakterien identifiziert werden, als im Gerinnsel ohne Thrombozyten. Thrombozyten sind demnach auch in einem Gerinnsel in der Lage, Bakterien mit ihren PMPs abzutöten. Kongruent zu unseren Daten zeigen Ali *et al.*, dass Thrombozyten nach Aktivierung mit Thrombin MRSA effektiv eliminieren können [213]. Interessanterweise waren in unseren Versuchen Wildtyp-Thrombozyten im Abtöten der Bakterien nicht effektiver als Thrombozyten von Mäusen, die aufgrund ihres genetischen Knockouts nur kleinere Bakterienaggregate bilden konnten. Die Anhäufung größerer Bakterienaggregate und der daraus resultierende höhere Anteil an Bakterien mit direktem Kontakt zu Thrombozyten, hat also keinen Einfluss auf die Effektivität ihrer bakteriziden Wirkung. Im Einklang zu unserer Datenlage zeigen die lebend/tot Analysen von Gärtner *et al.* ebenfalls keinen Unterschied im Anteil toter Bakterien zwischen nativen und MyH9-defizienten Thrombozyten [9].

Als Nächstes wurde die Rolle der Kontraktilität von Thrombozyten hinsichtlich der Immobilisierung von Pathogenen unter statischen Bedingungen zu untersucht. Dazu wurde ein Transmigrationsassay angewendet, dessen Prinzip von Macrae *et al.* beschrieben ist. Es basiert auf der Wanderung der Bakterien vom nährstoffarmen Gerinnsel in ein glukosehaltiges Medium [180]. Dieses Medium wurde anschließend auf Agar-Platten ausgestrichen. Die Anzahl der CFUs gab

Aufschluss über die Menge an Bakterien, die aus dem Gerinnsel emigrierte und somit nicht immobilisiert wurde.

Zunächst wurde der Einfluss des Fibrinnetzwerkes auf die Immobilisierung des *S. aureus* evaluiert. Während in Flüssigmedium suspendierte Bakterien bereits nach zwei Stunden im Medium detektiert werden konnten, wurden die ersten Bakterien aus dem Gerinnsel erst nach fünf Stunden im Medium nachgewiesen. Daraus konnte geschlossen werden, dass das Fibrinnetzwerk eine Barriere für die Bakterien darstellt. Erwartungsgemäß gelangten bei den Gerinnseln mit Thrombozyten signifikant weniger Bakterien ins Medium als beim Gerinnsel ohne Thrombozyten. Entgegen unserer Vermutungen jedoch, war kein signifikanter Unterschied zwischen den Gerinnseln mit Wildtyp-Thrombozyten und den MyH9-defizienten bzw. durch den Myosin IIa-Inhibitor para-Nitroblebbistatin gehemmten Thrombozyten nachzuweisen. Eine Ursache dafür könnte die Komprimierung der Gerinnsel durch Wildtyp-Thrombozyten sein. Im Gegensatz zum Gerinnsel mit Myosin IIa-defizienten Thrombozyten sind das Fibrinnetzwerk und die darin enthaltenen Bakterien nicht über die gesamte Transmigrationskammer verteilt. Durch die Kontraktionsarbeit der Thrombozyten wird das Gerinnsel sanduhrenförmig eingezogen und das Fibrinnetzwerk in der Transmigrationskammer komprimiert. Durch diesen Mechanismus könnten generell mehr Bakterien näher zum glukosehaltigen Medium gelangen und dementsprechend auch schneller in das Medium wandern. Dadurch könnte ein Unterschied in der Fähigkeit zur Pathogen-Immobilisierung zwischen intakten Thrombozyten und Myosin IIa-gehemmten bzw. -defizienten Thrombozyten verschleiert werden. Ein anderer möglicher Erklärungsversuch wäre, dass die Strukturierung des Fibrinnetzwerkes und das Festhalten der gebündelten Bakterien unter statischen Konditionen eine untergeordnete Rolle spielt und erst unter Fluss-Bedingungen einen entscheidenden Unterschied in der Zurückhaltung von Pathogenen macht.

Als Nächstes wurde nach Mechanismen gesucht, durch die die Wirkung der Thrombozyten im Transmigrationsassay erklärt werden konnte. Dafür wurden Gerinnsel mit den Sekreten aktivierter Thrombozyten versetzt und mit Kontroll-Gerinnseln verglichen. Es zeigte sich, dass in den Gerinnseln mit Sekreten signifikant weniger Bakterien im glukosehaltigen Medium detektiert werden konnten als im Medium der Kontrollgruppe. Die Sekrete von Thrombozyten

hindern die Bakterien somit daran, vom Gerinnsel ins Medium zu gelangen. Es liegt nahe, dass dieser Effekt in der bakteriziden Wirkung der Thrombozyten-Sekrete begründet ist, die durch unsere lebend/tot-Färbung der Gerinnsel bereits bestätigt werden konnte. Um den Einfluss der mechanischen Immobilisierung im Transmigrationsassay aufzuklären, wurden Gerinnsel mit Faktor XIII versetzt. Die Addition von Faktor XIII bewirkt eine Quervernetzung der Fibrinfasern. In einer Studie von Loof *et al.* zeigten die Autoren, dass durch die Verdichtung der Fibrinfasern durch Faktor XIII vermehrt Bakterien an Fibrin gebunden und immobilisiert werden [181]. Entgegen unserer Erwartung hatte der Zusatz von Faktor XIII keine Auswirkungen auf die Menge an Bakterien, die das Medium erreichten.

Im zweiten Teil der Arbeit wurde die Relevanz der kontraktilen Kräfte von Thrombozyten *in vivo* untersucht. Dazu wurde die infektiöse Endokarditis gewählt. Zu den häufigsten Erregern einer IE gehört *S. aureus* [102]. Im Rahmen der IE bildet *S. aureus* einen Biofilm, der im Grunde ein mit Bakterien infiltriertes Gerinnsel aus Thrombozyten und Fibrin darstellt. Ein Schlüsselereignis bei der Bildung eines Biofilms ist die Induktion des Koagulationssystems [137, 138]. Dadurch hüllt sich *S. aureus* in einen Schutzmantel aus Thrombozyten und Fibrin, der die Bakterien umgibt und sie vor der Immunantwort und Antibiotika schützt [214]. Dieser Mechanismus erschwert die Therapie einer IE und führt zu hohen Mortalitätsraten [140]. Über die Erreger der IE und deren Virulenzfaktoren zur Biofilm-Bildung ist viel erforscht. Bei der Untersuchung des Einflusses an der Entstehung von Biofilmen von wirtseigenen Zellen und deren Interaktionen mit Pathogenen besteht jedoch Forschungsbedarf. Vor allem Thrombozyten rücken dabei in den Fokus alternativer Therapieansätze. Im Biofilm sind Thrombozyten oft die einzigen Zellen, die im direkten Kontakt zu den Bakterien stehen [109]. Thrombozyten können an unterschiedlichen Zeit- und Ansatzpunkten in die Pathogenese der IE eingreifen: durch die Vermittlung der bakteriellen Adhäsion, durch ihre prokoagulatorische Wirkung, durch direktes Abtöten der Bakterien und durch die Interaktion mit Fibrin und Bakterien. Aufgrund der ambivalenten Rolle der Thrombozyten ist sich die Literatur über ihre Beteiligung bei der Formation des Biofilmes uneinig. In einem *in vivo* Modell zur IE am Kaninchen zeigten Nicolau *et al.*, dass eine antithrombotische Therapie mit Aspirin sowohl das Gewicht der Vegetationen reduziert als auch die Sterilisierung des Biofilms durch

Antibiotika unterstützt [162, 215]. Weiterhin konnten sie ebenfalls durch die kombinierte Gabe von Aspirin und Ticlopidin das Gewicht der Vegetationen senken. Die Masse an Bakterien im Biofilm wird durch die antithrombotische Therapie jedoch nicht verringert [216]. Im gleichen Modell konnten Sullam *et al.* 1996 nachweisen, dass eine herabgesetzte Thrombozytenbindung die Virulenz von *S. aureus* effektiv verringert [110]. Auch eine Veröffentlichung von Jung *et al.* bestätigt diese Ansätze und sagt aus, dass Thrombozyten die Formation eines Biofilms an den Herzklappen durch Streptokokken begünstigen [111]. Liesenborgh *et al.* postulieren hingegen, dass bei einer mechanisch induzierten IE, das Vorhandensein von Thrombozyten die Bildung des *S. aureus*-Biofilms nicht beeinflusst [189]. Eine weitere Publikation von Sullam *et al.* von 1993 beschreibt nach induzierter Thrombozytopenie sogar eine höhere Dichte an *S. sanguis* in den Vegetationen [78]. Unsere *in vitro* Ergebnisse zeigen, dass Thrombozyten unter Aufwendung Aktomyosin-abhängiger Kräfte in einem dreidimensionalen Fibrinnetzwerk mit Fibrinfasern interagieren und diese als eine Art „Lasso“ nutzen, um Bakterien zu sich heranzuziehen und zu bündeln. Durch ihre kontraktilen Kräfte könnten Thrombozyten also aktiv an der Struktur und Zusammensetzung des Biofilms beteiligt sein. Untersuchungen des Biofilms von Mäusen der Linie Pf4cre x MyH9^{flx/flx} könnten diesbezüglich neue Erkenntnisse bringen und einen Angriffspunkt für neue Therapien bieten.

Bemerkenswerterweise haben sich die *in vivo* Modelle zur IE kaum verändert, seit 1878 Ottomar Rosenbach zum ersten Mal eine Endokarditis beim Kaninchen auslöste, indem er eine kontaminierte Metall-Sonde durch die *A. carotis communis* bis zur Aortenklappe schob [217]. Heutzutage wird lediglich meist ein Polyethylen-Katheter verwendet, um ein Trauma an der Aortenklappe zu setzen [187]. In dieser Arbeit wurde der Katheter durch einen Faden mit der Stärke 2-0 ersetzt. Dieser hat den Vorteil gegenüber einem Katheter, dass er leicht gebogen und somit zielgerichteter an der Aortenklappe platziert werden kann. Alle Tiermodelle zur IE basieren auf einem ähnlichen methodischen Ablauf: Zuerst wird ein Katheter entweder über die rechte *A. carotis communis* bis zur Aortenklappe oder über den rechten Vorhof an die Trikuspidalklappe [184] anästhesierter Tiere geschoben und in Position belassen. Dadurch wird mit jedem Herzschlag ein Trauma an der Herzklappe gesetzt. Nach 24 Stunden wird den Tieren intravenös Bakterien verabreicht, die die defekte Herzklappe infizieren. Da

bei der Maus von Gibson *et al.* das Endokarditis-Modell nur für die Aortenklappe beschrieben ist [187], wurde diese Variation gewählt. Im vorliegenden Versuchsaufbau wurde sich jedoch dazu entschieden, den Katheter während der Operation nur für 30 Minuten an der Aortenklappe zu belassen und anschließend zu entfernen, wie es von Liesenborgh *et al.* publiziert ist [189]. Diese Abwandlung der typischen Versuchsdurchführung vermeidet, dass der permanente Katheter an der Herzklappe zur Plattform für injizierte Bakterien wird. Insofern spiegelt die kontinuierliche Präsenz von Fremdmaterial eher die klinischen Bedingungen einer Katheter-Infektion wieder als die einer IE. Nach histologischer Untersuchung des Klappenmaterials ist davon auszugehen, dass ein ausreichend großer Schaden bei einem Verbleiben des Fadens für 30 Minuten am Endothel gegeben ist. Durch diese methodische Variation wurde jedoch kein stetiger Defekt am Endothel provoziert, was eine negative Beeinflussung der Bildung von septischen Vegetationen zur Folge haben könnte. Um die bakterielle Adhärenz am frisch geschädigten Endothel zu erleichtern, wurde deshalb in dieser Arbeit die Infektion der Versuchstiere vorgezogen und bereits nach sechs Stunden durchgeführt.

Bei den bisher publizierten Endokarditis-Modellen an der Maus, wurde der Katheter zum Verletzen des Klappenendothels blind durch die *A. carotis communis* an die Aortenklappe vorgeschoben. Der Katheter wurde zum einen abgemessen und bis zu einer standardisierten Markierung eingeführt [187]. Zum anderen ging man von einem korrekten Sitz des Katheters aus, sobald die schnellen, vibrierenden Bewegungen der Aortenklappe bzw. das Pulsieren des linken Ventrikels auch am extrakorporalen Endstück des Katheters sichtbar waren [188, 189]. Nach unserem Kenntnisstand wurde eine Echokardiografie-kontrollierte Positionierung des Katheters bisher nur in Bezug auf das Endokarditis-Modell beim Kaninchen etabliert, bei der die Trikuspidalklappe verletzt wurde [218]. Um die Lage des Katheters zuverlässig und visuell überprüfen und damit einen Endothelschaden der Aortenklappe garantieren zu können, wurde im Rahmen dieser Arbeit eine Echokardiografiekontrolle des Endokarditis-Modells an der Maus etabliert. Somit konnte unter Berücksichtigung anatomischer Individualitäten zum einen das Einführen des Fadens durch die *A. carotis communis* echokardiografisch verfolgt und der Faden so positioniert werden, dass die Aortenklappe bei jedem Öffnen gegen den Faden schlug. Zum

anderen wurde nach 30 Minuten der korrekte Sitz des Fadens echokardiografisch überprüft und dadurch die Standardisierung der Methode erhöht. Durch paralleles Arbeiten wurde gleichzeitig der Faden in Position gebracht, während eine weitere Wissenschaftlerin die Echokardiografiekontrolle durchführte. Der zusätzliche Zeitaufwand der Echokardiografiekontrolle im Hinblick auf die Durchführung der Operation ist dementsprechend zu vernachlässigen.

Es stellte sich heraus, dass das Pulsieren des sichtbaren Faden-Endstückes kein zuverlässiges Indiz dafür war, dass die Aortenklappe an den Faden schlug. In einigen Fällen vibrierte der Faden, obwohl durch die echokardiografische Überprüfung seiner Lage ersichtlich war, dass sich Aortenklappe und Faden nicht berührten. Die vibrierenden Bewegungen des Fadens waren dann wahrscheinlich auf die Pulsation des linken Ventrikels oder auf den Kontakt des Fadens zur Gefäßwand im Bereich der *Aorta ascendens* zurückzuführen. Die korrekte Platzierung des Katheters ist das Kernelement des Endokarditis-Modells, denn nur so wird das Endothel geschädigt und dient als Plattform für die Adhäsion von Bakterien, Thrombozyten und Fibrin. Besonders unter Berücksichtigung des Prinzips der 3 R findet die Echokardiografiekontrolle auch unter Tierschutz-Aspekten hohe Relevanz. Durch die Echokardiografiekontrolle wird das Endokarditis-Modell optimiert und die Anzahl der Versuchstiere auf ein Mindestmaß reduziert. Aufgrund dessen, dass kein Fremdmaterial an den Klappen zurückbleibt, imitiert das Modell die pathophysiologische Situation einer IE sehr realistisch und kann durchaus für die Evaluierung des Biofilms herangezogen werden. Einen großen Nachteil dieses Modells stellt jedoch die sehr invasive Operation dar.

Während Versuchstiere des Wildtypstammes den chirurgischen Eingriff meist gut tolerierten, zeigten Tiere der Linie Pf4cre x MyH9^{flox/flox} nach der Operation ein stark reduziertes Allgemeinbefinden. Cre-positive Mäuse dieser Linie haben eine Thrombozytopenie und eine erhöhte Blutungsneigung [167], wodurch nach invasiven Operationen innere Blutungen auftreten können. Diese zusätzliche Kreislaufbelastung wurde von den Tieren, die im Rahmen des Endokarditis-Modells operiert wurden, nicht gut toleriert. Während der Operation musste ein Drittel der Knockout-Mäuse und nach Infektion innerhalb von 19 Stunden alle Mäuse dieses Stammes frühzeitig erlöst werden. Aus diesem Grund sind Mäuse der Linie Pf4-Cre x MyH9^{f1/f1} nicht für derart invasive Tiermodelle geeignet. Aus

Tierschutz-Gründen wurde deshalb die Endzahl an Versuchstieren nicht aufgefüllt. Diese Faktoren müssen bei der Interpretation der Datenlage berücksichtigt werden.

Es existiert eine Reihe von neueren, nicht invasiven Technologien zur Bestimmung der infektiösen Endokarditis, die serielle Messungen ermöglichen. Dazu zählen die Echokardiografie, eine Kombination aus Positronen-Emissions-Tomografie und Computertomografie (PET-CT) und ein Hybrid aus Fluoreszenz-Molekular-Tomografie und Computertomografie (FMT-CT) [214]. Diese Verfahren geben zwar eine zuverlässige Auskunft über das Vorhandensein einer Endokarditis, lassen jedoch durch ihre geringe räumliche und zeitliche Auflösung nur eine begrenzte Aussage über die Größe und Struktur der Vegetationen zu [214]. Außerdem lassen sich Biofilme damit erst in vorangeschrittenen Stadien darstellen. Weitere Nachteile liegen in der Kostenintensität, der teilweisen Strahlenbelastung und der technischen Limitation.

Neben den nicht-invasiven Methoden, gibt es einfache, zuverlässige und günstige Verfahren, um eine Endokarditis beim Versuchstier zu analysieren. Entscheidender Nachteil ist jedoch, dass die Tiere dazu euthanasiert werden müssen und es somit nicht möglich ist, den Verlauf der Biofilmbildung über einen längeren Zeitraum zu verfolgen. Eine gute Methode, um das Ausmaß der Biofilmbildung im Endokarditis-Modell zu bestimmen, ist die Exzision der bakteriellen Vegetationen aus der Herzklappe und die Quantifizierung der Bakterien mittels CFU/g des Biofilms. Dieses Verfahren ist jedoch nur bei größeren Tieren wie Ratten und Kaninchen möglich, da bei der Maus die Biofilme einen mikroskopischen Umfang haben und nicht individuell isoliert werden können. Stattdessen werden bei der Maus die gesamten Herzen oder standardisierte Teile des Herzens homogenisiert und durch die Bestimmung der CFU/g des Herzens die Masse der Bakterien bestimmt [187].

Da die Fragestellung dieser Arbeit jedoch auch auf die Struktur der Biofilme unter Beteiligung der Thrombozyten abzielte, war es sehr wichtig, eine hochauflösende Darstellung der Aortenklappe und den daran adhärierenden Vegetationen zu erhalten. Als schnelle, einfache und kostengünstige Methode eignet sich dazu die Immunhistochemie. Wichtig dabei sind profunde Kenntnisse der Zytologie, um die histologischen Präparate beurteilen zu können. Da es sich um eine explorative Studie handelt, eignet sich die Immunhistochemie sehr gut, um gegebenenfalls

optische Unterschiede zwischen den Gruppen in ihrer Biofilmbildung und -struktur, in der Interaktion von Thrombozyten und Bakterien und im Aufbau des Fibrinnetzwerkes visualisieren zu können.

Zunächst wurden Wildtyp-Mäuse der Linie C57BL/6J nach Induktion des Endothelschadens an der Aortenklappe mit dem *S. aureus* Stamm „Newman“, einem MSSA, infiziert. *S. aureus* Newman ist gut charakterisiert und wird im Versuchstierbereich aufgrund seines umfangreichen Spektrums an Virulenzfaktoren und seiner Fähigkeit, einen Biofilm zu bilden, häufig bei Modellen zu Infektionskrankheiten, insbesondere der IE, eingesetzt [195, 219]. Die Immunhistochemie zeigte, dass knapp 80 % der Tiere Auflagerungen aus Fibrin, Bakterien und Thrombozyten an den Herzklappen aufwiesen, sich jedoch nur bei 11 % der Tiere der gewünschte Biofilm bildete. Besonders im Hinblick auf das Prinzip der 3 R, ist eine Erfolgsrate von 11 % nicht zufriedenstellend und bedeutet, dass eine unverhältnismäßige Zahl an Mäusen in den Versuch genommen werden muss, um auf eine aussagekräftige Endzahl an Biofilmbildungen zu gelangen. Um die Inzidenz einer IE zu erhöhen, wurde als Nächstes der MRSA USA 300 für die Infektion der Mäuse verwendet, der phylogenetisch mit dem *S. aureus* Newman verwandt ist [195]. Dabei muss erwähnt werden, dass nicht die Resistenz gegenüber Antibiotika, sondern Biofilm-assoziierte Gene die biofilmbildenden Eigenschaften des *S. aureus* beeinflussen [220]. Nach Infektion mit *S. aureus* USA 300 entwickelte knapp die Hälfte der Mäuse Auflagerungen auf den Aortenklappen und 33 % der Tiere einen Biofilm. Die niedrige Inzidenz der Biofilmbildung im Rahmen einer mechanisch induzierten IE durch die Stämme Newman und USA 300 stimmt mit den Untersuchungen von Liesenborgh *et al.* überein [189]. Durch das Hinzuziehen eines klinischen MRSA konnten sie die Erfolgsrate eines Biofilms auf 80 % steigern. In dieser Arbeit erhöhte das klinische Isolat das Auftreten von Biofilmen auf 50 %. Obwohl die statistische Auswertung keine signifikante Differenz bezüglich der Ausbildung eines Biofilms zwischen den verschiedenen *S. aureus*-Stämmen zeigte, wurde der klinische MRSA für den Vergleich der Biofilmbildung von Wildtyp-Tieren und Mäusen der Linie Pf4-Cre x MyH9^{fl/fl} verwendet.

Die Auswertung der Immunhistochemie zeigte, dass 43 % der Kontrolltiere Auflagerungen und knapp 30 % einen Biofilm an den Aortenklappen entwickelten. Bei den Cre-positiven Tieren bildeten sich bei 67 % der Tiere Auflagerungen und bei 17 % ein Biofilm. Die statistische Auswertung gab keinen Hinweis auf einen deutlichen Effekt. Dies stellte einen weiteren Grund dar, aus Tierschutzgründen auf eine höhere Endzahl von Versuchstieren zu verzichten. Um strukturelle Unterschiede in der Biofilmformation zwischen den Gruppen darzustellen, wurden die Fluoreszenzsignale von Thrombozyten und Bakterien mit einer Software in Flächen umgewandelt und analysiert. Die Analysen des Verhältnisses von Thrombozyten zu Bakterien, um den Einfluss MyH9-defizienter Thrombozyten auf die Anlagerung und die Proliferation von Bakterien zu untersuchen, zeigen keinen statistisch signifikanten Unterschied zwischen den beiden Gruppen. Bei der Quantifizierung der Gesamtfläche der Bakterien in den Herzschnitten ist die gesamte Bakterienfläche beim Kontrolltier durchschnittlich größer als beim Cre-positiven Tier. Jedoch ist diese Tendenz bei der geringen Gruppengröße statistisch nicht signifikant. Sie könnte aber ein Hinweis darauf sein, dass das Bündeln der Bakterien durch Thrombozyten, das Wachstum der Bakterienkolonien aus oben genannten Gründen positiv beeinflusst. Bei der visuellen Beurteilung der septischen Vegetationen wurde der Eindruck gewonnen, dass sich bei der Kontrollgruppe die Thrombozyten- und Bakteriensignale häufiger überschneiden als beim Knockout. Aus diesem Grund und im Hinblick auf die *in vitro* Ergebnisse, wurde der Anteil der Thrombozytenfläche berechnet, der mit einer Bakterienfläche kolokalisierte. Auch hier ergaben die Analysen keinen signifikanten Unterschied, gleichwohl eine Tendenz zu erkennen war, dass beim Knockout im Schnitt ein geringerer Anteil der Thrombozyten mit Bakterien assoziiert war. Bakterien, die nicht mit Thrombozyten bedeckt sind, könnten im Biofilm zugänglicher für Leukozyten und Antibiotika sein. Da die Sekretionsfähigkeit von MyH9-defizienten Thrombozyten dabei nicht beeinträchtigt ist [167], werden die Bakterien in den Vegetationen ebenfalls – wie auch die *in vitro* Ergebnisse zeigen – von den PMS der Thrombozyten abgetötet. Dabei ist zu berücksichtigen, dass die Erreger einer IE oftmals resistent gegenüber den mikroziden Eigenschaften von Thrombozyten sind [113] und diese deshalb im Rahmen einer klinischen IE generell eine untergeordnete Rolle spielen könnten.

Wie bereits erwähnt, wurde aus Tierschutz-Gründen die Anzahl der Versuchstiere nicht aufgefüllt und ist daher, vor allem unter Berücksichtigung der hohen Varianz der Ergebnisse, als sehr niedrig ($n = 5$) und als wenig aussagekräftig zu bewerten. Außerdem sind die Ergebnisse der Auswertung wegen der unterschiedlichen Todeszeitpunkte der Mäuse nur bedingt vergleichbar. Nichtsdestotrotz weisen Tendenzen in der Biofilmformation darauf hin, dass der genetische Knockout des MyH9-Gens in den Thrombozyten den Schweregrad einer IE mildern und einen neuen Therapieansatz darstellen könnte. Darüber könnten weitere Untersuchungen, die den Verlauf einer Biofilmformation über einen längeren Zeitraum erlauben, Aufschluss geben. Besonders interessant könnten weiterführende Studien sein, die die Empfindlichkeit der Biofilme mit Kontraktions-defizienten Thrombozyten gegenüber antimikrobiellen Therapien evaluieren. Unsere erhobenen *in vitro* Daten geben Hinweis darauf, dass durch die Bildung kleinerer Thrombozyten-Bakterien-Assoziate und der reduzierten Interaktion mit Fibrin, MyH9-defiziente Thrombozyten einen modifizierten Biofilm bilden. Sowohl die wirtseigene Immunantwort als auch Antibiotika könnten dann in die tieferen Strukturen des Biofilms eindringen und die Entwicklung von resistenten Persisterzellen frühzeitig verhindern.

VII. ZUSAMMENFASSUNG

In der vorliegenden Arbeit wurde die Rolle der Kontraktilität von Thrombozyten hinsichtlich der Interaktion mit *S. aureus* im Fibrinnetzwerk untersucht.

Fluoreszenzmikroskopische Analysen von Gerinnseln aus Thrombozyten, *S. aureus* und Fibrin zeigen, dass Thrombozyten Bakterien *in vitro* zu Aggregaten bündeln. Wird das Myosin IIa, das für die Kontraktionsfähigkeit der Thrombozyten verantwortlich ist, gehemmt, befinden sich zum einen signifikant weniger Bakterien in direktem Kontakt zu Thrombozyten, zum anderen ist die Größe der Bakterienaggregate signifikant geringer. In weiteren Versuchen stellte sich heraus, dass die Bildung von Aggregaten besonders unter Fluss-Bedingungen eine große Rolle spielt. In Gerinnseln mit kontraktionsfähigen Thrombozyten werden signifikant mehr Bakterien zurückgehalten als in Gerinnseln mit Myosin IIa-gehemmten Thrombozyten. Im Rahmen einer Infektion könnten Thrombozyten durch diesen Mechanismus die bakterielle Clearance erhöhen. Unter statischen Bedingungen scheinen die kontraktilen Kräfte der Thrombozyten bei der Immobilisierung von Pathogenen eine untergeordnete Rolle zu spielen. Ebenso gibt es keinen Hinweis darauf, dass durch die Bildung größerer Bakterienaggregate die Effizienz der bakteriziden Wirkung von Thrombozyten gesteigert wird. Gerinnsel aus Fibrin, Thrombozyten und Bakterien erinnern in ihrer Struktur an pathologische Biofilme, die u.a. im Rahmen einer IE auftreten. In einem *in vivo* Endokarditis-Modell wurden *S. aureus*-Biofilme immunhistochemisch untersucht. Im Zuge dessen wurde eine Echokardiographiekontrolle des Endokarditis-Modells an der Maus etabliert, die dazu beiträgt, die Methode hinsichtlich des Prinzips der 3R zu verbessern. Es konnte die Tendenz festgestellt werden, dass Mäuse mit MyH9-defizienten Thrombozyten eine geringere Masse an Bakterien in den Vegetationen aufweisen und die Thrombozyten weniger häufig mit Bakterien kolokalisieren als bei Wildtyp-Tieren. Hierbei bedarf es jedoch geeigneterer Modelle und weiterer Forschung, um die Rolle der kontraktilen Kräfte von Thrombozyten in Bezug auf die Formation eines Biofilmes zu evaluieren. Aus diesen Erkenntnissen könnten sich neue und dringend benötigte Therapieansätze ableiten lassen, um die Bildung eines Biofilms bei Infektionskrankheiten einzudämmen.

VIII. SUMMARY

This study examined the role of platelet contractility in the interaction of *S. aureus* in a fibrin network.

Using confocal microscopy analyses of a clot consisting of platelets, *S. aureus* and fibrin show, that platelets bundle bacteria *in vitro*. When Myosin IIa, which is responsible for platelet contractility, is inhibited, significantly less bacteria are directly bound to platelets. Moreover, the size of the bacterial aggregates is significantly smaller. Further investigations showed, that the formation of bacterial aggregates plays an important role during flow-conditions. In clots with contractile platelets significantly more bacteria are retained in the clot than in clots with Myosin IIa-inhibited platelets. During infections, platelets could use this mechanism to increase the bacterial clearance. In static conditions, the role of platelet contractility seems to play a minor role in the immobilization of pathogens. Also, there is no evidence, that formation of larger bacteria bundles increases the efficiency of the platelet bactericidal proteins. Clots of fibrin, platelets and bacteria resemble the structure of pathologic biofilms, that are formed e.g. during infectious endocarditis. Using an *in vivo* endocarditis-model, *S. aureus* biofilms were examined by immunohistochemistry. In the course of that, an echocardiography control of the endocarditis model in mice was established. It contributes to the improvement of the method regarding the 3R principle. A tendency could be determined, that mice with myosin IIa-deficient platelets contain a lower mass of bacteria in the vegetations and that the platelets and bacteria colocalize less frequently than in wildtype animals. Here it needs optimized models and further research to evaluate the role of platelet contractility in biofilm formation. These findings could lead to new and urgently needed therapeutic strategies to contain the formation of biofilms during infectious diseases.

IX. ABBILDUNGSVERZEICHNIS

<i>Abbildung 1: Elektronenmikroskopische Aufnahme eines Thrombozyten.....</i>	<i>3</i>
<i>Abbildung 2: Schematische Darstellung der Hämostase</i>	<i>6</i>
<i>Abbildung 3: Schematische Darstellung der vier Schritte der Zellmigration</i>	<i>7</i>
<i>Abbildung 4: Beginn der Thrombozytenmigration</i>	<i>9</i>
<i>Abbildung 5: Blebbistatin-behandelte Thrombozyten</i>	<i>10</i>
<i>Abbildung 6: Schematische Darstellung der Interaktion von Thrombozyten mit Pathogenen</i>	<i>12</i>
<i>Abbildung 7: Wandernde Thrombozyten bündeln Bakterien effektiver.....</i>	<i>15</i>
<i>Abbildung 8: Thrombozyten bündeln Bakterien in der Leber</i>	<i>16</i>
<i>Abbildung 9: Infektiöse Endokarditis</i>	<i>18</i>
<i>Abbildung 10: Lebenszyklus Biofilm</i>	<i>23</i>
<i>Abbildung 11: Darstellung des Transmigrationsassays.....</i>	<i>42</i>
<i>Abbildung 12: Darstellung des Überstand-Assays.....</i>	<i>44</i>
<i>Abbildung 13: Schematische Darstellung des Endokarditis-Modells</i>	<i>46</i>
<i>Abbildung 14: Score Sheet.....</i>	<i>48</i>
<i>Abbildung 15: Ultraschallbild der Aortenklappe</i>	<i>51</i>
<i>Abbildung 16: Repräsentative Aufnahmen der Gerinnsel in der μ-Kammer</i>	<i>59</i>
<i>Abbildung 17: Analyse der Gerinnsel anhand der Imaris Software.....</i>	<i>60</i>
<i>Abbildung 18: Repräsentative Aufnahmen zur Interaktion von Thrombozyten und Bakterien.....</i>	<i>62</i>
<i>Abbildung 19: Größe der Bakterien-Aggregate in den Gerinnseln.....</i>	<i>64</i>
<i>Abbildung 20: Struktur der Fibrinnetzwerke unter statischen und unter Fluss-Bedingungen</i>	<i>66</i>
<i>Abbildung 21: Gesamtfläche der Bakterien nach statischen und Fluss-Bedingungen</i>	<i>67</i>
<i>Abbildung 22: Durch den Fluss ausgespülter Anteil der Bakterienfläche</i>	<i>68</i>
<i>Abbildung 23: Der Anteil der Bakterienfläche in Kolo-kalisation mit Thrombozyten unter statischen und Fluss-Bedingungen.....</i>	<i>69</i>
<i>Abbildung 24: Die Größe der Bakterienaggregate unter Fluss-Bedingungen.....</i>	<i>71</i>
<i>Abbildung 25: Größe der Bakterienaggregate unter statischen und Fluss-Bedingungen beim Wildtyp</i>	<i>72</i>

<i>Abbildung 26: Größe der Bakterienaggregate unter statischen und Fluss-Bedingungen im Gerinnsel mit Blebbistatin-inhibierten Thrombozyten</i>	<i>73</i>
<i>Abbildung 27: Repräsentative Aufnahmen der lebend/tot Färbung in den Gerinnseln.....</i>	<i>74</i>
<i>Abbildung 28: Anteil der abgetöteten Bakterien</i>	<i>75</i>
<i>Abbildung 29: Zeitlicher Verlauf der Transmigration der Bakterien durch die Filterporen.....</i>	<i>77</i>
<i>Abbildung 30: Fotografien der Gerinnsel in der Transmigrationskammer nach Inkubation</i>	<i>77</i>
<i>Abbildung 31: Anzahl der im Medium ausplattierten Bakterienkolonien</i>	<i>79</i>
<i>Abbildung 32: Anzahl der im Medium ausplattierten Bakterienkolonien</i>	<i>80</i>
<i>Abbildung 33: Repräsentative Ultraschallaufnahmen während des Vorschiebens des Fadens an die Aortenklappe.....</i>	<i>81</i>
<i>Abbildung 34: Repräsentative Aufnahmen einer unverletzten (A) und verletzten (B) Aortenklappe mit CD31 Färbung</i>	<i>83</i>
<i>Abbildung 35: Repräsentative Aufnahme eines Biofilms an der Aortenklappe einer C57BL/6J-Maus</i>	<i>84</i>
<i>Abbildung 36: Anlagerungen und Biofilmformationen beim Wildtyp nach Infektion mit verschiedenen S. aureus-Stämmen.....</i>	<i>85</i>
<i>Abbildung 37: Repräsentative Aufnahme des Biofilms an der Aortenklappe von Pf4cre x MyH9^{flx/flx}-Mäusen</i>	<i>86</i>
<i>Abbildung 38: Anlagerungen und Biofilmformationen bei der Linie Pf4cre x MyH9^{fl/fl} nach Infektion mit dem klinischen S. aureus Stamm</i>	<i>87</i>
<i>Abbildung 39: Fläche an Bakterien in den Herzklappenschnitten</i>	<i>88</i>
<i>Abbildung 40: Verhältnis der Thrombozyten zu den Bakterien an den Vegetationen</i>	<i>89</i>
<i>Abbildung 41: Repräsentative Aufnahmen von Bereichen mit Thrombozyten und S. aureus</i>	<i>90</i>
<i>Abbildung 42: Anteil der Thrombozytenfläche in Kolokalisation mit Bakterien...</i>	<i>91</i>

X. TABELLENVERZEICHNIS

<i>Tabelle 1: Komponenten und Konzentrationen im μ-Kammer-Assay</i>	<i>39</i>
<i>Tabelle 2: Komponenten und Konzentrationen im Transmigrationsassay</i>	<i>43</i>
<i>Tabelle 3: Komponenten und Konzentrationen im Überstands-Assay</i>	<i>45</i>
<i>Tabelle 4: Übersicht der verwendeten Antikörper</i>	<i>55</i>

XI. ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

ADP	Adenosindiphosphat
°C	Grad Celsius
A.	Arteria
AF	Alexa Fluor
ATP	Adenosintriphosphat
BHI	Brain-Heart-Infusion
Blebb	Para-Nitroblebbistatin
ca.	zirka
CD	Cluster of Differentiation
CFU	Colony-forming Unit
ClfA	Clumping Factor A
CLSM	Confocal Laser Scanning Microscopy
cm	Zentimeter
Coa	Staphylocoagulase
DB	Elektronendichte Granula
DMSO	Dimethylsulfoxid
DTS	Dichtes Röhrensystem
E. coli	Escherichia coli
EaP	Extrazelluläres adhärentes Protein
Fa.	Firma
FnBP	Fibronectin-bindendes Protein
g	Erdschwerebeschleunigung
G	Gauge
G	Granula
GFP	Grün-fluoreszierendes Protein
i.p.	intraperitoneal
i.v.	intravenös
IE	Infektiöse Endokarditis
IVC	Individually Ventilated Cabinet
kg	Kilogramm
KO	Knockout
MC	Membrankomplex
mg	Milligramm
ml	Milliliter
MLC	Myosin-Light-Chain
MLCK	Myosin-light-Chain-Kinase
mM	Millimolar
MRSA	Methicillin-resistenter Staphylococcus aureus
MSCRAMMs	microbial surface components reorganizing adhesive matrix molecules
MSSA	Methicillin-sensibler Staphylococcus aureus
MT	Mikrotubuli
MyH9	Myosin-heavy-Chain 9
NaCl	Natriumchlorid
NaHCO ₃	Natriumhydrogencarbonat
NETs	Neutrophil Extracellular Traps
NMHC IIA	Muscle myosin heavy chain IIA

OCS	Offenes kanalikuläres System
OD	Optische Dichte
PBP2a	Penicillin Bindeprotein
PBS	Phosphate-buffered saline
PFA	Paraformaldehyd
pH	negativ dekadischer Logarithmus der Wasserstoffionen- Aktivität
Plts	Thrombozyten
PMP	Platelet microbicidal Protein
PMS	Polymorphkernige Neutrophile
PRP	Platelet Rich Plasma
<i>S. aureus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
s.c.	subkutan
S2	Sicherheitsstufe 2
SCC-mec	Staphylococcal cassette chromosome-mec
SEM	Standardfehler des Mittelwertes
SERAMs	secretable expanded repertoire adhesive molecules
SPF	Specific Pathogen Free
TC	Thrombozidin
TF	Gewebefaktor
TXA ₂	Thromboxan
u.a.	unter anderem
V.	Vena
vWF	Von-Willebrand-Faktor
vWFbP	Von-Willebrand-Faktor-bindendes Protein
WT	Wildtyp
ZNP	Zentrum für Neuropathologie und Prionenforschung
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µm	Mikrometer
µM	Mikromolar

XII. LITERATURVERZEICHNIS

1. Brewer, D.B., *Max Schultze (1865), G. Bizzozero (1882) and the discovery of the platelet*. Br J Haematol, 2006. **133**(3): p. 251-8.
2. Engelmann, B. and S. Massberg, *Thrombosis as an intravascular effector of innate immunity*. Nat Rev Immunol, 2013. **13**(1): p. 34-45.
3. Smith, S.A., et al., *Polyphosphate modulates blood coagulation and fibrinolysis*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2006. **103**(4): p. 903-8.
4. Muller, F., et al., *Platelet polyphosphates are proinflammatory and procoagulant mediators in vivo*. Cell, 2009. **139**(6): p. 1143-56.
5. Gaertner, F. and S. Massberg, *Blood coagulation in immunothrombosis-At the frontline of intravascular immunity*. Semin Immunol, 2016. **28**(6): p. 561-569.
6. Miajlovic, H., et al., *Both complement- and fibrinogen-dependent mechanisms contribute to platelet aggregation mediated by Staphylococcus aureus clumping factor B*. Infect Immun, 2007. **75**(7): p. 3335-43.
7. Donlan, R.M. and J.W. Costerton, *Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms*. Clin Microbiol Rev, 2002. **15**(2): p. 167-93.
8. Kiedrowski, M.R. and A.R. Horswill, *New approaches for treating staphylococcal biofilm infections*. Ann N Y Acad Sci, 2011. **1241**: p. 104-21.
9. Gaertner, F., et al., *Migrating Platelets Are Mechano-scavengers that Collect and Bundle Bacteria*. Cell, 2017. **171**(6): p. 1368-1382.e23.

10. Fukuda, T.A., Eri; Nogi, Kimiku; Goto, Kazuo, *Evaluation of mouse red blood cell and platelet counting with an automated hematology analyzer*. The Journal of Veterinary Medical Science, 2017.
11. Patel, S.R., J.H. Hartwig, and J.E. Italiano, Jr., *The biogenesis of platelets from megakaryocyte proplatelets*. J Clin Invest, 2005. **115**(12): p. 3348-54.
12. Ciminno, G. and P. Golino, *Platelet biology and receptor pathways*. J Cardiovasc Transl Res, 2013. **6**(3): p. 299-309.
13. Eicher, J.D., G. Lettre, and A.D. Johnson, *The genetics of platelet count and volume in humans*. Platelets, 2018. **29**(2): p. 125-130.
14. Kaplan, J.E. and T.M. Saba, *Platelet removal from the circulation by the liver and spleen*. Am J Physiol, 1978. **235**(3): p. H314-20.
15. Rendu, F. and B. Brohard-Bohn, *The platelet release reaction: granules' constituents, secretion and functions*. Platelets, 2001. **12**(5): p. 261-73.
16. Joshi, S. and S.W. Whiteheart, *The nuts and bolts of the platelet release reaction*. Platelets, 2017. **28**(2): p. 129-137.
17. Rendu, F., et al., *Initial characterization of human platelet mepacrine-labelled granules isolated using a short metrizamide gradient*. Br J Haematol, 1982. **52**(2): p. 241-51.
18. Ambrosio, A.L. and S.M. Di Pietro, *Storage pool diseases illuminate platelet dense granule biogenesis*. Platelets, 2017. **28**(2): p. 138-146.
19. Du, X. and M.H. Ginsberg, *Integrin alpha IIb beta 3 and platelet function*. Thromb Haemost, 1997. **78**(1): p. 96-100.

20. Hayward, C.P., et al., *Factor V is complexed with multimerin in resting platelet lysates and colocalizes with multimerin in platelet alpha-granules*. J Biol Chem, 1995. **270**(33): p. 19217-24.
21. Blair, P. and R. Flaumenhaft, *Platelet alpha-granules: basic biology and clinical correlates*. Blood Rev, 2009. **23**(4): p. 177-89.
22. Thon, J.N. and J.E. Italiano, *Platelets: production, morphology and ultrastructure*. Handb Exp Pharmacol, 2012(210): p. 3-22.
23. White, J.G., *Platelets are coverocytes, not phagocytes: uptake of bacteria involves channels of the open canalicular system*. Platelets, 2005. **16**(2): p. 121-31.
24. Levin, J., *I - The Evolution of Mammalian Platelets*. 2019: Academic Press.
25. Hose, J.E., G.G. Martin, and A.S. Gerard, *A Decapod Hemocyte Classification Scheme Integrating Morphology, Cytochemistry, and Function*. The Biological Bulletin, 1990. **178**(1): p. 33-45.
26. Götz, P.B., HG, *Comprehensive Insect Physiology, Biochemistry and Pharmacology*. Vol. 3. 1985, Oxford: Pergamon Press.
27. Semple, J.W., J.E. Italiano, Jr., and J. Freedman, *Platelets and the immune continuum*. Nat Rev Immunol, 2011. **11**(4): p. 264-74.
28. Ghoshal, K. and M. Bhattacharyya, *Overview of platelet physiology: its hemostatic and nonhemostatic role in disease pathogenesis*. ScientificWorldJournal, 2014. **2014**: p. 781857.
29. Koupenova, M., et al., *Circulating Platelets as Mediators of Immunity, Inflammation, and Thrombosis*. Circ Res, 2018. **122**(2): p. 337-351.

30. Jurk, K. and B.E. Kehrel, *Platelets: physiology and biochemistry*. Semin Thromb Hemost, 2005. **31**(4): p. 381-92.
31. Clemetson, K.J. and J.M. Clemetson, *Platelet GPIb-V-IX complex. Structure, function, physiology, and pathology*. Semin Thromb Hemost, 1995. **21**(2): p. 130-6.
32. Dorsam, R.T. and S.P. Kunapuli, *Central role of the P2Y12 receptor in platelet activation*. J Clin Invest, 2004. **113**(3): p. 340-5.
33. Brass, L.F., L. Zhu, and T.J. Stalker, *Minding the gaps to promote thrombus growth and stability*. J Clin Invest, 2005. **115**(12): p. 3385-92.
34. Holinstat, M., *Normal platelet function*. Cancer Metastasis Rev, 2017. **36**(2): p. 195-198.
35. Jackson, S.P., *Arterial thrombosis--insidious, unpredictable and deadly*. Nat Med, 2011. **17**(11): p. 1423-36.
36. Bettex-Galland, M. and E.F. Luescher, *Extraction of an actomyosin-like protein from human thrombocytes*. Nature, 1959. **184**(Suppl 5): p. 276-7.
37. Kraemer, B.F., et al., *PI3 kinase-dependent stimulation of platelet migration by stromal cell-derived factor 1 (SDF-1)*. J Mol Med (Berl), 2010. **88**(12): p. 1277-88.
38. Lowenhaupt, R.W., et al., *Factors which influence blood platelet migration*. J Lab Clin Med, 1977. **90**(1): p. 37-45.
39. Nathan, P., *The migration of human platelets in vitro*. Thromb Diath Haemorrh, 1973. **30**(1): p. 173-7.

40. Valone, F.H., K.F. Austen, and E.J. Goetzl, *Modulation of the random migration of human platelets*. J Clin Invest, 1974. **54**(5): p. 1100-6.
41. Pitchford, S.C., et al., *Allergen induces the migration of platelets to lung tissue in allergic asthma*. Am J Respir Crit Care Med, 2008. **177**(6): p. 604-12.
42. Schmidt, E.M., et al., *Ion channels in the regulation of platelet migration*. Biochem Biophys Res Commun, 2011. **415**(1): p. 54-60.
43. Lauffenburger, D.A. and A.F. Horwitz, *Cell migration: a physically integrated molecular process*. Cell, 1996. **84**(3): p. 359-69.
44. Yam, P.T., et al., *Actin-myosin network reorganization breaks symmetry at the cell rear to spontaneously initiate polarized cell motility*. J Cell Biol, 2007. **178**(7): p. 1207-21.
45. Barnhart, E.L., et al., *An adhesion-dependent switch between mechanisms that determine motile cell shape*. PLoS Biol, 2011. **9**(5): p. e1001059.
46. Ananthakrishnan, R. and A. Ehrlicher, *The forces behind cell movement*. Int J Biol Sci, 2007. **3**(5): p. 303-17.
47. Pollard, T.D. and G.G. Borisy, *Cellular motility driven by assembly and disassembly of actin filaments*. Cell, 2003. **112**(4): p. 453-65.
48. Welch, M.D. and R.D. Mullins, *Cellular control of actin nucleation*. Annu Rev Cell Dev Biol, 2002. **18**: p. 247-88.
49. Pollard, T.D. and J.A. Cooper, *Actin, a central player in cell shape and movement*. Science, 2009. **326**(5957): p. 1208-12.
50. Jay, P.Y., et al., *A mechanical function of myosin II in cell motility*. J Cell Sci, 1995. **108** (Pt 1): p. 387-93.

-
51. Lee, J., et al., *Regulation of cell movement is mediated by stretch-activated calcium channels*. Nature, 1999. **400**(6742): p. 382-6.
52. Yang, S. and X.Y. Huang, *Ca²⁺ influx through L-type Ca²⁺ channels controls the trailing tail contraction in growth factor-induced fibroblast cell migration*. J Biol Chem, 2005. **280**(29): p. 27130-7.
53. Gupton, S.L. and C.M. Waterman-Storer, *Spatiotemporal feedback between actomyosin and focal-adhesion systems optimizes rapid cell migration*. Cell, 2006. **125**(7): p. 1361-74.
54. Keren, K., et al., *Mechanism of shape determination in motile cells*. Nature, 2008. **453**(7194): p. 475-80.
55. Nieswandt, B., et al., *Costimulation of Gi- and G12/G13-mediated signaling pathways induces integrin alpha IIb beta 3 activation in platelets*. J Biol Chem, 2002. **277**(42): p. 39493-8.
56. Gawaz, M., *Blood platelets*. 2001, Stuttgart: Thieme Verlag.
57. Park, K., F.W. Mao, and H. Park, *The minimum surface fibrinogen concentration necessary for platelet activation on dimethyldichlorosilane-coated glass*. J Biomed Mater Res, 1991. **25**(3): p. 407-20.
58. Varga-Szabo, D., A. Braun, and B. Nieswandt, *Calcium signaling in platelets*. J Thromb Haemost, 2009. **7**(7): p. 1057-66.
59. Brundage, R.A., et al., *Calcium gradients underlying polarization and chemotaxis of eosinophils*. Science, 1991. **254**(5032): p. 703-6.
60. Cines, D.B., et al., *Clot contraction: compression of erythrocytes into tightly packed polyhedra and redistribution of platelets and fibrin*. Blood, 2014. **123**(10): p. 1596-603.

61. Muthard, R.W. and S.L. Diamond, *Blood clots are rapidly assembled hemodynamic sensors: flow arrest triggers intraluminal thrombus contraction*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2012. **32**(12): p. 2938-45.
62. Lam, W.A., et al., *Mechanics and contraction dynamics of single platelets and implications for clot stiffening*. Nat Mater, 2011. **10**(1): p. 61-6.
63. Jennings, L.K., et al., *Changes in the cytoskeletal structure of human platelets following thrombin activation*. J Biol Chem, 1981. **256**(13): p. 6927-32.
64. Nakata, T. and N. Hirokawa, *Cytoskeletal reorganization of human platelets after stimulation revealed by the quick-freeze deep-etch technique*. J Cell Biol, 1987. **105**(4): p. 1771-80.
65. Qiu, Y., et al., *Platelet mechanosensing of substrate stiffness during clot formation mediates adhesion, spreading, and activation*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2014. **111**(40): p. 14430-5.
66. Litvinov, R.I., et al., *The Platelet Integrin α IIb β 3 Differentially Interacts with Fibrin Versus Fibrinogen*. J Biol Chem, 2016. **291**(15): p. 7858-67.
67. Liang, X.M., et al., *Platelet retraction force measurements using flexible post force sensors*. Lab Chip, 2010. **10**(8): p. 991-8.
68. Wufsus, A.R., et al., *Elastic behavior and platelet retraction in low- and high-density fibrin gels*. Biophys J, 2015. **108**(1): p. 173-83.
69. Stalker, T.J., et al., *A systems approach to hemostasis: 3. Thrombus consolidation regulates intrathrombus solute transport and local thrombin activity*. Blood, 2014. **124**(11): p. 1824-31.

-
70. Carr, M.E., Jr., *Development of platelet contractile force as a research and clinical measure of platelet function*. Cell Biochem Biophys, 2003. **38**(1): p. 55-78.
71. Kim, O.V., et al., *Quantitative structural mechanobiology of platelet-driven blood clot contraction*. Nat Commun, 2017. **8**(1): p. 1274.
72. Nicolai, L., F. Gaertner, and S. Massberg, *Platelets in Host Defense: Experimental and Clinical Insights*. Trends Immunol, 2019.
73. Kraemer, B.F., et al., *Novel anti-bacterial activities of beta-defensin 1 in human platelets: suppression of pathogen growth and signaling of neutrophil extracellular trap formation*. PLoS Pathog, 2011. **7**(11): p. e1002355.
74. Yeaman, M.R., et al., *Platelet microbicidal proteins and neutrophil defensin disrupt the Staphylococcus aureus cytoplasmic membrane by distinct mechanisms of action*. J Clin Invest, 1998. **101**(1): p. 178-87.
75. Yeaman, M.R., et al., *Purification and in vitro activities of rabbit platelet microbicidal proteins*. Infect Immun, 1997. **65**(3): p. 1023-31.
76. Koo, S.P., et al., *The cytoplasmic membrane is a primary target for the staphylocidal action of thrombin-induced platelet microbicidal protein*. Infect Immun, 1997. **65**(11): p. 4795-800.
77. Dankert, J., et al., *Involvement of bactericidal factors from thrombin-stimulated platelets in clearance of adherent viridans streptococci in experimental infective endocarditis*. Infect Immun, 1995. **63**(2): p. 663-71.
78. Sullam, P.M., et al., *Effect of thrombocytopenia on the early course of streptococcal endocarditis*. J Infect Dis, 1993. **168**(4): p. 910-4.

79. Krijgsveld, J., et al., *Thrombocidins, microbicidal proteins from human blood platelets, are C-terminal deletion products of CXC chemokines*. J Biol Chem, 2000. **275**(27): p. 20374-81.
80. Sevitt, S., *Thrombosis and embolism after injury*. J Clin Pathol Suppl (R Coll Pathol), 1970. **4**: p. 86-101.
81. Peerschke, E.I., T.K. Murphy, and B. Ghebrehiwet, *Activation-dependent surface expression of gC1qR/p33 on human blood platelets*. Thromb Haemost, 2003. **89**(2): p. 331-9.
82. McDonald, B., et al., *Intravascular neutrophil extracellular traps capture bacteria from the bloodstream during sepsis*. Cell Host Microbe, 2012. **12**(3): p. 324-33.
83. Youssefian, T., et al., *Host defense role of platelets: engulfment of HIV and Staphylococcus aureus occurs in a specific subcellular compartment and is enhanced by platelet activation*. Blood, 2002. **99**(11): p. 4021-9.
84. Siboo, I.R., et al., *Clumping factor A mediates binding of Staphylococcus aureus to human platelets*. Infect Immun, 2001. **69**(5): p. 3120-7.
85. Hamzeh-Cognasse, H., et al., *Platelets and infections - complex interactions with bacteria*. Front Immunol, 2015. **6**: p. 82.
86. Stahl, A.L., et al., *Lipopolysaccharide from enterohemorrhagic Escherichia coli binds to platelets through TLR4 and CD62 and is detected on circulating platelets in patients with hemolytic uremic syndrome*. Blood, 2006. **108**(1): p. 167-76.
87. Greenlee-Wacker, M., F.R. DeLeo, and W.M. Nauseef, *How methicillin-resistant Staphylococcus aureus evade neutrophil killing*. Curr Opin Hematol, 2015. **22**(1): p. 30-5.

88. Kolaczowska, E., et al., *Molecular mechanisms of NET formation and degradation revealed by intravital imaging in the liver vasculature*. Nat Commun, 2015. **6**: p. 6673.
89. Pettersson, G.B. and S.T. Hussain, *Current AATS guidelines on surgical treatment of infective endocarditis*. Ann Cardiothorac Surg, 2019. **8**(6): p. 630-644.
90. Holland, T.L., et al., *Infective endocarditis*. Nat Rev Dis Primers, 2016. **2**: p. 16059.
91. Que, Y.A. and P. Moreillon, *Infective endocarditis*. Nat Rev Cardiol, 2011. **8**(6): p. 322-36.
92. Tong, S.Y., et al., *Staphylococcus aureus infections: epidemiology, pathophysiology, clinical manifestations, and management*. Clin Microbiol Rev, 2015. **28**(3): p. 603-61.
93. Sporn, L.A., V.J. Marder, and D.D. Wagner, *Inducible secretion of large, biologically potent von Willebrand factor multimers*. Cell, 1986. **46**(2): p. 185-90.
94. Viela, F., et al., *Bacterial pathogens under high-tension: Staphylococcus aureus adhesion to von Willebrand factor is activated by force*. Microb Cell, 2019. **6**(7): p. 321-323.
95. Bombeli, T., B.R. Schwartz, and J.M. Harlan, *Adhesion of activated platelets to endothelial cells: evidence for a GPIIbIIIa-dependent bridging mechanism and novel roles for endothelial intercellular adhesion molecule 1 (ICAM-1), alphavbeta3 integrin, and GPIbalpha*. J Exp Med, 1998. **187**(3): p. 329-39.
96. Hemler, M.E., et al., *Structure of the integrin VLA-4 and its cell-cell and cell-matrix adhesion functions*. Immunol Rev, 1990. **114**: p. 45-65.

-
97. Cahill, T.J., et al., *Do patients at risk of infective endocarditis need antibiotics before dental procedures?* Bmj, 2017. **358**: p. j3942.
98. Veltrop, M.H., et al., *Role of monocytes in experimental Staphylococcus aureus endocarditis.* Infect Immun, 2000. **68**(8): p. 4818-21.
99. Werdan, K., et al., *Mechanisms of infective endocarditis: pathogen-host interaction and risk states.* Nat Rev Cardiol, 2014. **11**(1): p. 35-50.
100. Flick, M.J., et al., *Leukocyte engagement of fibrin(ogen) via the integrin receptor α M β 2/Mac-1 is critical for host inflammatory response in vivo.* J Clin Invest, 2004. **113**(11): p. 1596-606.
101. Fernandez Guerrero, M.L., et al., *Infective endocarditis at autopsy: a review of pathologic manifestations and clinical correlates.* Medicine (Baltimore), 2012. **91**(3): p. 152-64.
102. Selton-Suty, C., et al., *Preeminence of Staphylococcus aureus in infective endocarditis: a 1-year population-based survey.* Clin Infect Dis, 2012. **54**(9): p. 1230-9.
103. Habib, G., et al., *Guidelines on the prevention, diagnosis, and treatment of infective endocarditis (new version 2009): the Task Force on the Prevention, Diagnosis, and Treatment of Infective Endocarditis of the European Society of Cardiology (ESC). Endorsed by the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ESCMID) and the International Society of Chemotherapy (ISC) for Infection and Cancer.* Eur Heart J, 2009. **30**(19): p. 2369-413.
104. Diab, M., et al., *Impact of perioperative liver dysfunction on in-hospital mortality and long-term survival in infective endocarditis patients.* Infection, 2017. **45**(6): p. 857-866.

105. Thuny, F., et al., *Management of infective endocarditis: challenges and perspectives*. The Lancet, 2012. **379**(9819): p. 965-975.
106. Cahill, T.J., et al., *Challenges in Infective Endocarditis*. J Am Coll Cardiol, 2017. **69**(3): p. 325-344.
107. Moreillon, P., Y.A. Que, and A.S. Bayer, *Pathogenesis of streptococcal and staphylococcal endocarditis*. Infect Dis Clin North Am, 2002. **16**(2): p. 297-318.
108. Verhamme, P. and M.F. Hoylaerts, *Hemostasis and inflammation: two of a kind?* Thromb J, 2009. **7**: p. 15.
109. Liesenborghs, L., et al., *Coagulation: at the heart of infective endocarditis*. J Thromb Haemost, 2020.
110. Sullam, P.M., et al., *Diminished platelet binding in vitro by Staphylococcus aureus is associated with reduced virulence in a rabbit model of infective endocarditis*. Infect Immun, 1996. **64**(12): p. 4915-21.
111. Jung, C.J., et al., *Platelets enhance biofilm formation and resistance of endocarditis-inducing streptococci on the injured heart valve*. J Infect Dis, 2012. **205**(7): p. 1066-75.
112. Dall, L., et al., *Platelet depletion and severity of streptococcal endocarditis*. Can J Infect Dis, 1998. **9**(6): p. 359-66.
113. Wu, T., M.R. Yeaman, and A.S. Bayer, *In vitro resistance to platelet microbicidal protein correlates with endocarditis source among bacteremic staphylococcal and streptococcal isolates*. Antimicrob Agents Chemother, 1994. **38**(4): p. 729-32.

-
114. Peacock, S.J., I. de Silva, and F.D. Lowy, *What determines nasal carriage of Staphylococcus aureus?* Trends Microbiol, 2001. **9**(12): p. 605-10.
115. Lowy, F.D., *Staphylococcus aureus infections*. N Engl J Med, 1998. **339**(8): p. 520-32.
116. Kock, R., et al., *Methicillin-resistant Staphylococcus aureus (MRSA): burden of disease and control challenges in Europe*. Euro Surveill, 2010. **15**(41): p. 19688.
117. Lindsay, J.A., *Genomic variation and evolution of Staphylococcus aureus*. Int J Med Microbiol, 2010. **300**(2-3): p. 98-103.
118. Hiramatsu, K., et al., *The emergence and evolution of methicillin-resistant Staphylococcus aureus*. Trends Microbiol, 2001. **9**(10): p. 486-93.
119. Foster, T.J. and M. Hook, *Surface protein adhesins of Staphylococcus aureus*. Trends Microbiol, 1998. **6**(12): p. 484-8.
120. Chavakis, T., et al., *Staphylococcus aureus interactions with the endothelium: the role of bacterial "secretable expanded repertoire adhesive molecules" (SERAM) in disturbing host defense systems*. Thromb Haemost, 2005. **94**(2): p. 278-85.
121. Claes, J., et al., *Clumping factor A, von Willebrand factor-binding protein and von Willebrand factor anchor Staphylococcus aureus to the vessel wall*. J Thromb Haemost, 2017. **15**(5): p. 1009-1019.
122. Hienz, S.A., et al., *Collagen binding of Staphylococcus aureus is a virulence factor in experimental endocarditis*. J Infect Dis, 1996. **174**(1): p. 83-8.

123. Sinha, B., et al., *Fibronectin-binding protein acts as Staphylococcus aureus invasin via fibronectin bridging to integrin alpha5beta1*. Cell Microbiol, 1999. **1**(2): p. 101-17.
124. Que, Y.A., et al., *Fibrinogen and fibronectin binding cooperate for valve infection and invasion in Staphylococcus aureus experimental endocarditis*. J Exp Med, 2005. **201**(10): p. 1627-35.
125. Heying, R., et al., *Fibronectin-binding proteins and clumping factor A in Staphylococcus aureus experimental endocarditis: FnBPA is sufficient to activate human endothelial cells*. Thromb Haemost, 2007. **97**(4): p. 617-26.
126. Pappelbaum, K.I., et al., *Ultralarge von Willebrand factor fibers mediate luminal Staphylococcus aureus adhesion to an intact endothelial cell layer under shear stress*. Circulation, 2013. **128**(1): p. 50-9.
127. Weidenmaier, C., et al., *Lack of wall teichoic acids in Staphylococcus aureus leads to reduced interactions with endothelial cells and to attenuated virulence in a rabbit model of endocarditis*. J Infect Dis, 2005. **191**(10): p. 1771-7.
128. Fitzgerald, J.R., et al., *Fibronectin-binding proteins of Staphylococcus aureus mediate activation of human platelets via fibrinogen and fibronectin bridges to integrin GPIIb/IIIa and IgG binding to the FcgammaRIIa receptor*. Mol Microbiol, 2006. **59**(1): p. 212-30.
129. Arman, M., et al., *Amplification of bacteria-induced platelet activation is triggered by FcgammaRIIA, integrin alphaIIb beta3, and platelet factor 4*. Blood, 2014. **123**(20): p. 3166-74.
130. Bertling, A., et al., *Staphylococcal extracellular adherence protein induces platelet activation by stimulation of thiol isomerases*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2012. **32**(8): p. 1979-90.

-
131. Edwards, A.M., et al., *Staphylococcus aureus extracellular adherence protein triggers TNFalpha release, promoting attachment to endothelial cells via protein A*. PLoS One, 2012. **7**(8): p. e43046.
132. Salgado-Pabon, W., et al., *Superantigens are critical for Staphylococcus aureus Infective endocarditis, sepsis, and acute kidney injury*. MBio, 2013. **4**(4).
133. Chung, J.W., et al., *Superantigen profiling of Staphylococcus aureus infective endocarditis isolates*. Diagn Microbiol Infect Dis, 2014. **79**(2): p. 119-24.
134. Krogman, A., et al., *HLA-DR polymorphisms influence in vivo responses to staphylococcal toxic shock syndrome toxin-1 in a transgenic mouse model*. Hla, 2017. **89**(1): p. 20-28.
135. Veltrop, M.H., H. Beekhuizen, and J. Thompson, *Bacterial species- and strain-dependent induction of tissue factor in human vascular endothelial cells*. Infect Immun, 1999. **67**(11): p. 6130-8.
136. Herzberg, M.C., et al., *The platelet interactivity phenotype of Streptococcus sanguis influences the course of experimental endocarditis*. Infect Immun, 1992. **60**(11): p. 4809-18.
137. Bayer, A.S., et al., *Staphylococcus aureus induces platelet aggregation via a fibrinogen-dependent mechanism which is independent of principal platelet glycoprotein IIb/IIIa fibrinogen-binding domains*. Infect Immun, 1995. **63**(9): p. 3634-41.
138. Vanassche, T., et al., *Fibrin formation by staphylothrombin facilitates Staphylococcus aureus-induced platelet aggregation*. Thromb Haemost, 2012. **107**(6): p. 1107-21.

-
139. del Pozo, J.L. and R. Patel, *The challenge of treating biofilm-associated bacterial infections*. Clin Pharmacol Ther, 2007. **82**(2): p. 204-9.
140. Davies, D., *Understanding biofilm resistance to antibacterial agents*. Nat Rev Drug Discov, 2003. **2**(2): p. 114-22.
141. Sievert, D.M., et al., *Antimicrobial-resistant pathogens associated with healthcare-associated infections: summary of data reported to the National Healthcare Safety Network at the Centers for Disease Control and Prevention, 2009-2010*. Infect Control Hosp Epidemiol, 2013. **34**(1): p. 1-14.
142. Lister, J.L. and A.R. Horswill, *Staphylococcus aureus biofilms: recent developments in biofilm dispersal*. Front Cell Infect Microbiol, 2014. **4**: p. 178.
143. Kaplan, J.B., *Biofilm dispersal: mechanisms, clinical implications, and potential therapeutic uses*. J Dent Res, 2010. **89**(3): p. 205-18.
144. Moormeier, D.E., et al., *Temporal and stochastic control of Staphylococcus aureus biofilm development*. MBio, 2014. **5**(5): p. e01341-14.
145. Moormeier, D.E. and K.W. Bayles, *Staphylococcus aureus biofilm: a complex developmental organism*. Mol Microbiol, 2017. **104**(3): p. 365-376.
146. Montanaro, L., et al., *Extracellular DNA in biofilms*. Int J Artif Organs, 2011. **34**(9): p. 824-31.
147. Mann, E.E., et al., *Modulation of eDNA release and degradation affects Staphylococcus aureus biofilm maturation*. PLoS One, 2009. **4**(6): p. e5822.
148. Speziale, P., et al., *Protein-based biofilm matrices in Staphylococci*. Front Cell Infect Microbiol, 2014. **4**: p. 171.

149. Foulston, L., et al., *The extracellular matrix of Staphylococcus aureus biofilms comprises cytoplasmic proteins that associate with the cell surface in response to decreasing pH*. MBio, 2014. **5**(5): p. e01667-14.
150. Otto, M., *Staphylococcal infections: mechanisms of biofilm maturation and detachment as critical determinants of pathogenicity*. Annu Rev Med, 2013. **64**: p. 175-88.
151. Jabbouri, S. and I. Sadovskaya, *Characteristics of the biofilm matrix and its role as a possible target for the detection and eradication of Staphylococcus epidermidis associated with medical implant infections*. FEMS Immunol Med Microbiol, 2010. **59**(3): p. 280-91.
152. Paharik, A.E. and A.R. Horswill, *The Staphylococcal Biofilm: Adhesins, Regulation, and Host Response*. Microbiol Spectr, 2016. **4**(2).
153. Lewis, K., *Persister cells: molecular mechanisms related to antibiotic tolerance*. Handb Exp Pharmacol, 2012(211): p. 121-33.
154. Durack, D.T., *Experimental bacterial endocarditis. IV. Structure and evolution of very early lesions*. J Pathol, 1975. **115**(2): p. 81-9.
155. Fitzgerald, J.R., T.J. Foster, and D. Cox, *The interaction of bacterial pathogens with platelets*. Nat Rev Microbiol, 2006. **4**(6): p. 445-57.
156. O'Brien, L., et al., *Multiple mechanisms for the activation of human platelet aggregation by Staphylococcus aureus: roles for the clumping factors ClfA and ClfB, the serine-aspartate repeat protein SdrE and protein A*. Mol Microbiol, 2002. **44**(4): p. 1033-44.

157. Habib, G., et al., *2015 ESC Guidelines for the management of infective endocarditis: The Task Force for the Management of Infective Endocarditis of the European Society of Cardiology (ESC). Endorsed by: European Association for Cardio-Thoracic Surgery (EACTS), the European Association of Nuclear Medicine (EANM)*. Eur Heart J, 2015. **36**(44): p. 3075-3128.
158. Simoes, M., *Antimicrobial strategies effective against infectious bacterial biofilms*. Curr Med Chem, 2011. **18**(14): p. 2129-45.
159. Wolcott, R.D. and D.D. Rhoads, *A study of biofilm-based wound management in subjects with critical limb ischaemia*. J Wound Care, 2008. **17**(4): p. 145-8, 150-2, 154-5.
160. Chen, M., Q. Yu, and H. Sun, *Novel strategies for the prevention and treatment of biofilm related infections*. Int J Mol Sci, 2013. **14**(9): p. 18488-501.
161. Vanassche, T., et al., *Anti-thrombotic therapy in infective endocarditis*. Expert Rev Cardiovasc Ther, 2011. **9**(9): p. 1203-19.
162. Nicolau, D.P., et al., *Influence of aspirin on development and treatment of experimental Staphylococcus aureus endocarditis*. Antimicrob Agents Chemother, 1995. **39**(8): p. 1748-51.
163. Veloso, T.R., et al., *Aspirin plus ticlopidine prevented experimental endocarditis due to Enterococcus faecalis and Streptococcus gallolyticus*. Pathog Dis, 2015. **73**(8): p. ftv060.
164. Veloso, T.R., et al., *Prophylaxis of experimental endocarditis with antiplatelet and antithrombin agents: a role for long-term prevention of infective endocarditis in humans?* J Infect Dis, 2015. **211**(1): p. 72-9.
165. Elgharably, H., et al., *Current Hypotheses in Cardiac Surgery: Biofilm in Infective Endocarditis*. Semin Thorac Cardiovasc Surg. **28**(1): p. 56-9.

-
166. Berg, J.S., B.C. Powell, and R.E. Cheney, *A millennial myosin census*. Mol Biol Cell, 2001. **12**(4): p. 780-94.
167. Leon, C., et al., *Megakaryocyte-restricted MYH9 inactivation dramatically affects hemostasis while preserving platelet aggregation and secretion*. Blood, 2007. **110**(9): p. 3183-91.
168. Vicente-Manzanares, M., et al., *Non-muscle myosin II takes centre stage in cell adhesion and migration*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2009. **10**(11): p. 778-90.
169. TVT, A.f.r.T.i.d.G.-S.u.A.i.d. *Empfehlung zur Blutentnahme bei Versuchstieren, insbesondere kleinen Versuchstieren*. 2009.
170. Mulisch, M.W., U., *Romeis Mikroskopische Technik*. 2010.
171. Kolossov, V.L., et al., *Airyscan super-resolution microscopy of mitochondrial morphology and dynamics in living tumor cells*. Microsc Res Tech, 2018. **81**(2): p. 115-128.
172. Davidson, K.N.F.M.W., *Fluorescent Biomarkers in Neurons*. Encyclopedia of Neuroscience, 2009.
173. Falati, S., et al., *Real-time in vivo imaging of platelets, tissue factor and fibrin during arterial thrombus formation in the mouse*. Nat Med, 2002. **8**(10): p. 1175-81.
174. Grosse, J., et al., *An EF hand mutation in Stim1 causes premature platelet activation and bleeding in mice*. J Clin Invest, 2007. **117**(11): p. 3540-50.
175. Analytics, E. *Datasheet # X488*. 2008.

176. Berney, M., et al., *Assessment and interpretation of bacterial viability by using the LIVE/DEAD BacLight Kit in combination with flow cytometry*. Appl Environ Microbiol, 2007. **73**(10): p. 3283-90.
177. Invitrogen. *LIVE / Dead BacLight Bacterial Viability kits*. 2004; Available from: <https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/LSG/manuals/mp07007.pdf>.
178. Robertson, J., et al., *Optimisation of the Protocol for the LIVE/DEAD((R)) BacLight(TM) Bacterial Viability Kit for Rapid Determination of Bacterial Load*. Front Microbiol, 2019. **10**: p. 801.
179. Kepiro, M., et al., *para-Nitrolebbistatin, the non-cytotoxic and photostable myosin II inhibitor*. Angew Chem Int Ed Engl, 2014. **53**(31): p. 8211-5.
180. Macrae, F.L., et al., *A fibrin biofilm covers blood clots and protects from microbial invasion*. J Clin Invest, 2018. **128**(8): p. 3356-3368.
181. Loof, T.G., et al., *Coagulation, an ancestral serine protease cascade, exerts a novel function in early immune defense*. Blood, 2011. **118**(9): p. 2589-98.
182. Hoerr, V., et al., *S. aureus endocarditis: Clinical aspects and experimental approaches*. Int J Med Microbiol, 2018. **308**(6): p. 640-652.
183. Highman, B., P.D. Altland, and J. Roshe, *Staphylococcal endocarditis and glomerulonephritis in dogs*. Circ Res, 1959. **7**: p. 982-7.
184. Garrison, P.K. and L.R. Freedman, *Experimental endocarditis I. Staphylococcal endocarditis in rabbits resulting from placement of a polyethylene catheter in the right side of the heart*. Yale J Biol Med, 1970. **42**(6): p. 394-410.

185. Baddour, L.M., et al., *Production of experimental endocarditis by coagulase-negative staphylococci: variability in species virulence*. J Infect Dis, 1984. **150**(5): p. 721-7.
186. Durack, D.T. and P.B. Beeson, *Experimental bacterial endocarditis. I. Colonization of a sterile vegetation*. Br J Exp Pathol, 1972. **53**(1): p. 44-9.
187. Gibson, G.W., et al., *Development of a mouse model of induced Staphylococcus aureus infective endocarditis*. Comp Med, 2007. **57**(6): p. 563-9.
188. Ring, J., et al., *MRI visualization of Staphylococcus aureus-induced infective endocarditis in mice*. PLoS One, 2014. **9**(9): p. e107179.
189. Liesenborghs, L., et al., *Staphylococcus aureus endocarditis: distinct mechanisms of bacterial adhesion to damaged and inflamed heart valves*. Eur Heart J, 2019. **40**(39): p. 3248-3259.
190. Gerabek, W.H., B;Keil, G;Wegner, W, *Enzyklopädie Medizingeschichte. Ultraschall-Diagnostik*, ed. C. Borck. 2005, Berlin/ New York: Wegner, W.
191. Böhmeke, T.S., A, *Checkliste Echokardiographie*. 2008: Thieme Verlag.
192. Kuter, D.J. and R.D. Rosenberg, *The reciprocal relationship of thrombopoietin (c-Mpl ligand) to changes in the platelet mass during busulfan-induced thrombocytopenia in the rabbit*. Blood, 1995. **85**(10): p. 2720-30.
193. Nakagawa, S. and I.C. Cuthill, *Effect size, confidence interval and statistical significance: a practical guide for biologists*. Biol Rev Camb Philos Soc, 2007. **82**(4): p. 591-605.
194. Russell, W.M.S. and R.L. Burch, *The principles of humane experimental technique*. 1959: Methuen.

195. Baba, T., et al., *Genome sequence of Staphylococcus aureus strain Newman and comparative analysis of staphylococcal genomes: polymorphism and evolution of two major pathogenicity islands*. J Bacteriol, 2008. **190**(1): p. 300-10.
196. King, M.D., et al., *Emergence of community-acquired methicillin-resistant Staphylococcus aureus USA 300 clone as the predominant cause of skin and soft-tissue infections*. Ann Intern Med, 2006. **144**(5): p. 309-17.
197. Buer, J. and R. Balling, *Mice, microbes and models of infection*. Nat Rev Genet, 2003. **4**(3): p. 195-205.
198. Perlman, R.L., *Mouse models of human disease: An evolutionary perspective*. Evol Med Public Health, 2016. **2016**(1): p. 170-6.
199. Rosenthal, N. and S. Brown, *The mouse ascending: perspectives for human-disease models*. Nat Cell Biol, 2007. **9**(9): p. 993-9.
200. Warren, H.S., et al., *Mice are not men*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2015. **112**(4): p. E345-E345.
201. Parker, D., *Humanized mouse models of Staphylococcus aureus infection*. Frontiers in immunology, 2017. **8**: p. 512.
202. Seok, J., et al., *Genomic responses in mouse models poorly mimic human inflammatory diseases*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2013. **110**(9): p. 3507-3512.
203. Ehrlicher, A. and J.H. Hartwig, *Cell mechanics: Contracting to stiffness*. Nat Mater, 2011. **10**(1): p. 12-3.
204. Monroe, D.M., M. Hoffman, and H.R. Roberts, *Platelets and thrombin generation*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2002. **22**(9): p. 1381-9.

205. Bouchard, B.A. and P.B. Tracy, *Platelets, leukocytes, and coagulation*. Curr Opin Hematol, 2001. **8**(5): p. 263-9.
206. Cheng, A.G., et al., *Contribution of coagulases towards Staphylococcus aureus disease and protective immunity*. PLoS Pathog, 2010. **6**(8): p. e1001036.
207. Niemann, S., et al., *Soluble fibrin is the main mediator of Staphylococcus aureus adhesion to platelets*. Circulation, 2004. **110**(2): p. 193-200.
208. Fux, C.A., S. Wilson, and P. Stoodley, *Detachment characteristics and oxacillin resistance of Staphylococcus aureus biofilm emboli in an in vitro catheter infection model*. J Bacteriol, 2004. **186**(14): p. 4486-91.
209. Gronnemoose, R.B., et al., *A novel in vitro model for haematogenous spreading of S. aureus device biofilms demonstrating clumping dispersal as an advantageous dissemination mechanism*. Cell Microbiol, 2017. **19**(12).
210. Jen, C.J. and L.V. McIntire, *The structural properties and contractile force of a clot*. Cell Motil, 1982. **2**(5): p. 445-55.
211. Prasad, J.M., et al., *Mice expressing a mutant form of fibrinogen that cannot support fibrin formation exhibit compromised antimicrobial host defense*. Blood, 2015. **126**(17): p. 2047-58.
212. Sun, H., et al., *Reduced thrombin generation increases host susceptibility to group A streptococcal infection*. Blood, 2009. **113**(6): p. 1358-64.
213. Ali, R.A., et al., *Platelets Mediate Host Defense against Staphylococcus aureus through Direct Bactericidal Activity and by Enhancing Macrophage Activities*. J Immunol, 2017. **198**(1): p. 344-351.

214. Panizzi, P., et al., *In vivo detection of Staphylococcus aureus endocarditis by targeting pathogen-specific prothrombin activation*. Nat Med, 2011. **17**(9): p. 1142-6.
215. Nicolau, D.P., et al., *Reduction of bacterial titers by low-dose aspirin in experimental aortic valve endocarditis*. Infect Immun, 1993. **61**(4): p. 1593-5.
216. Nicolau, D.P., P.R. Tessier, and C.H. Nightingale, *Beneficial effect of combination antiplatelet therapy on the development of experimental Staphylococcus aureus endocarditis*. Int J Antimicrob Agents, 1999. **11**(2): p. 159-61.
217. Contrepolis, A., *Notes on the early history of infective endocarditis and the development of an experimental model*. Clin Infect Dis, 1995. **20**(2): p. 461-6.
218. Wang, M.L., et al., *A rabbit model of right-sided Staphylococcus aureus endocarditis created with echocardiographic guidance*. Cardiovasc Ultrasound, 2013. **11**: p. 3.
219. Spaulding, A.R., et al., *Comparison of Staphylococcus aureus strains for ability to cause infective endocarditis and lethal sepsis in rabbits*. Front Cell Infect Microbiol, 2012. **2**: p. 18.
220. Ghasemian, A., et al., *Comparison of Biofilm Formation between Methicillin-Resistant and Methicillin-Susceptible Isolates of Staphylococcus aureus*. Iran Biomed J, 2016. **20**(3): p. 175-81.

XIII. DANKSAGUNG

Als erstes möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. med. Steffen Massberg für die Möglichkeit bedanken, in dieser Forschungsgruppe arbeiten zu dürfen.

Bei Herrn Priv.-Doz. Dr. med. vet. Sven Reese bedanke ich mich herzlich für die Übernahme, Durchsicht und Einreichung dieser Dissertation an der Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München. Außerdem bedanke ich mich herzlich für die statistische Beratung.

Bedanken möchte ich mich außerdem bei Herrn PhD Dr. med. Florian Gärtner, dessen Ideen die Grundlage dieser Arbeit waren. Ich bedanke mich herzlich für die Unterstützung und Betreuung, die wesentlich zum Gelingen dieser Dissertation beigetragen haben.

Mein besonderer Dank gilt Dr. med. vet. Gerhild Rosenberger, die mich auf dem Weg zur Dissertation von Anfang an begleitete. Während der gesamten Zeit stand sie mir stets mit konstruktiven Ratschlägen und motivierenden Worten zur Seite. Ich möchte mich herzlich für die Einarbeitung, die Hilfe bei den *in vivo* Experimenten und die gesamte Betreuung bedanken. Ihr großes Engagement trug maßgeblich zum Gelingen dieser Arbeit bei.

Außerdem möchte ich mich bei der gesamten AG Massberg für die tolle Arbeitsatmosphäre und die gegenseitige Unterstützung bedanken. Besonders hervorheben möchte ich an dieser Stelle Michael Lorenz, dessen umfangreiches Wissen und unzählige Ratschläge mir stets eine große Hilfe waren. Bei PhD Shuxia Fan bedanke ich mich für die Einarbeitung. Bei Dominic van den Heuvel möchte ich mich für die technische Unterstützung herzlich bedanken. Mein großer Dank gilt auch den fleißigen KorrekturleserInnen Sarah Herbst, Magdalena Leibl und Dr. med. vet. Niklas Bürgener.

Ganz besonders möchte ich mich bei meinen Eltern für ihre immerwährende Unterstützung bedanken. Ihr Vertrauen und ihre lieben und motivierenden Worte haben mir immer Kraft gegeben und den Rücken gestärkt.

Mein besonders großer Dank geht an meinen Freund Philipp. Danke für deine Unterstützung, deine Geduld und deine liebe, verständnisvolle Art!